

# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO  
PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

VYUŽITÍ SEPARAČNÍCH METOD PRO STANOVENÍ VYBRANÝCH  
LÉČIV VE VODÁCH

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. JITKA TRTÍLKOVÁ

BRNO 2008



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ  
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ  
ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY  
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY  
INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF  
ENVIRONMENTAL PROTECTION

## VYUŽITÍ SEPARAČNÍCH METOD PRO STANOVENÍ VYBRANÝCH LÉČIV VE VODÁCH

APPLICATION OF SEPARATION METHODS FOR THE DETERMINATION  
OF SELECTED PHARMACEUTICALS IN WATERS

DIPLOMOVÁ PRÁCE  
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

Bc. JITKA TRTÍLKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE  
SUPERVISOR

prof. RNDr. MILADA VÁVROVÁ, CSc.

BRNO 2008



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce

**FCH-DIP0250/2007**

Akademický rok: **2007/2008**

Ústav

Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí

Student(ka)

**Trtílková Jitka Bc.**

Studijní program

Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805)

Studijní obor

Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)

Vedoucí diplomové práce

**prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.**

Konzultanti diplomové práce

### Název diplomové práce:

Využití separačních metod pro stanovení vybraných léčiv ve vodách

### Zadání diplomové práce:

1. Zpracování literární rešerše
2. Výběr hodnocených léčiv a výběr ověřovaných ČOV
3. Vypracování metody a její ověření na modelových studiích
4. Stanovení reziduí léčiv v reálných vzorcích
5. Zhodnocení výsledků

### Termín odevzdání diplomové práce: 16.5.2008

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

---

Bc. Jitka Trtílková  
student(ka)

---

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.  
Vedoucí práce

---

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2007

---

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.  
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

Antibiotika patří mezi široce používaná léčiva v humánní i veterinární medicíně. Tyto látky jsou biologicky aktivní a snižují účinnost biologických procesů v čistírnách odpadních vod. Dochází tak k jejich nedostatečnému odstranění a průniku do vyčištěné vody.

Existuje několik separačních metod, kterými mohou být antibiotika v odpadních vodách stanovena. Jsou to především kapalinová chromatografie, plynová chromatografie a kapilární elektroforéza.

Cílem této diplomové práce bylo vypracovat vhodnou izolační techniku a analytický postup pro identifikaci a stanovení penicilinových antibiotik v odpadní vodě. Pro stanovení byly ze širokého spektra penicilinových antibiotik vybrány amoxicilin, ampicilin a benzylpenicilin (penicilin G). Vybraná antibiotika patří mezi často aplikovaná v praxi. Pomocí optimalizované metody pak byly tyto látky stanoveny v reálných vzorcích z čistírny odpadních vod v areálu Veterinární a farmaceutické univerzity Brno a velkokapacitní čistírny odpadních vod v Brně-Modřicích.

Reálné vzorky odpadních vod byly přečištěny a zakoncentrovány pomocí SPE extrakce (extrakce pevnou fází). Vlastní stanovení penicilinových antibiotik bylo provedeno metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s UV-VIS detektorem typu DAD.

Klíčová slova: antibiotika, kapalinová chromatografie (HPLC), čistírna odpadních vod (ČOV)

## ABSTRACT

Antibiotics are widely used pharmaceuticals in human and veterinary medicine. These compounds are biologically active. They decrease efficiency of biological processes in wastewater treatment plants. Antibiotics are not eliminated from sewage water completely and they are discharged as contaminants into the receiving waters.

Several methods exist for the determination of antibiotics in sewage water. In the first place liquid chromatography, gas chromatography and capillary electrophoresis are used.

The aim of this thesis was to develop a suitable isolation technique and an optimal analytical method for identification and determination of penicillins in wastewater. For determination was selected amoxicillin, ampicillin and benzylpenicillin (penicillin G). These are very often used penicillins. An optimized method was used for determination of these penicillins in real samples from a wastewater treatment plant situated in Veterinary and pharmaceutical university in Brno and from the large-scale wastewater treatment plant in Brno-Modřice.

Real samples were concentrated using SPE (solid phase extraction). For penicillins determination were used high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC/DAD).

Key words: antibiotics, liquid chromatography (HPLC), wastewater treatment plant (WWTP)

TRTÍLKOVÁ, J. Využití separačních metod pro stanovení vybraných léčiv ve vodách. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 92 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis diplomanta

*Poděkování:*

*Chtěla bych poděkovat paní Prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. a Ing. Haně Vítečkové za odborné vedení a cenné rady při zpracování této práce.*

# OBSAH

<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>7</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>8</b>
2.1 Antibiotika.....	8
2.1.1. Historie antibiotik .....	8
2.1.2. Rozdělení antibiotik .....	9
2.1.2.1. Podle způsobu přípravy .....	9
2.1.2.2. Podle způsobu účinku .....	9
2.1.3 Mechanismus účinku.....	10
2.1.3.1. Inhibice syntézy buněčné stěny.....	10
2.1.3.2. Poškození funkce cytoplasmatické membrány .....	11
2.1.3.3. Porušení syntézy bílkovin.....	11
2.1.3.4. Porušení syntézy nukleových kyselin.....	11
2.1.3.5. Kompetitivní inhibice .....	11
2.1.4. Rezistence .....	12
2.1.4.1. Mechanismy rezistence.....	13
2.1.4.2. Zkřížená rezistence .....	13
2.1.5 Farmakokinetika .....	14
2.1.5.1. Absorpce a distribuce léčiv v organismu .....	14
2.1.5.2. Biotransformace léčiv .....	15
2.1.5.3. Exkrece léčiv.....	16
2.1.6. Cyklus antibiotik v životním prostředí.....	17
2.1.7. Léčiva v čistírnách odpadních vod.....	19
2.2. Peniciliny.....	20
2.2.1. Struktura .....	20
2.2.2. Rozdělení penicilinů.....	21
2.2.3. Mechanismus účinku penicilinů .....	21
2.2.4. Inhibitory $\beta$ -laktamáz .....	23
2.2.5. Farmakokinetika penicilinů .....	23
2.2.6. Nežádoucí účinky penicilinů .....	24
2.3. Charakteristika vybraných penicilinů .....	24
2.3.1. Penicilin G (benzylpenicilin) .....	24
2.3.2. Ampicilin .....	25
2.3.3. Amoxicilin .....	25
2.4. Metody stanovení léčiv .....	26
2.4.1. Odběry vzorků z čistíren odpadních vod.....	26
2.4.2. Úprava vzorku.....	27
2.4.2.1. Extrakce tuhou fází (SPE).....	27
2.4.2.2. Lyofilizace .....	29
2.4.3. Vlastní separační metoda.....	30
2.4.4. Kapalinová chromatografie .....	30
2.4.4.1. Kapalinový chromatograf .....	31
2.4.4.2. Detektory v HPLC.....	32
2.4.4.3. HPLC-MS .....	34
2.4.4.4. Separace antibiotik HPLC .....	36
2.4.5. Plynová chromatografie .....	37
2.4.5.1. Plynový chromatograf .....	37
2.4.5.2. Detektory v GC .....	39

2.4.5.3. GC-MS.....	40
2.4.5.4. Separace antibiotik GC.....	41
2.4.6. Kapilární elektromigrační metody.....	42
2.4.6.1. Kapilární zónová elektroforéza.....	42
2.4.6.2. Instrumentace CZE.....	43
2.4.6.3. Micelární elektrokinetická chromatografie.....	44
2.4.6.4. Separace antibiotik CE.....	46
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>47</b>
3.1. Přístroje, zařízení, software.....	47
3.1.1. Příprava a extrakce vzorků.....	47
3.1.2. Kapalinová chromatografie.....	47
3.2. Používané chemikálie a standardy.....	47
3.2.1. Chemikálie.....	47
3.2.2. Standardy.....	48
3.3. Sledovaná matrice.....	48
3.4. Sledované analyty.....	48
3.4.1. Penicilin G (benzylpenicilin).....	48
3.4.2. Ampicilin.....	48
3.4.3. Amoxicilin.....	48
3.5. Pracovní postupy.....	49
3.5.1. Odběry vzorků.....	49
3.5.2. Úprava vzorků a izolace analytů.....	49
3.5.3. Analýza vzorků a standardů.....	51
3.5.3.1. Chromatografické podmínky analýzy.....	52
<b>4. VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>53</b>
4.1. Určení chromatografických podmínek.....	53
4.1.1. Mobilní fáze.....	53
4.1.2. Průtok mobilní fáze.....	56
4.1.3. Gradient mobilní fáze.....	58
4.1.4. Teplota kolony.....	58
4.1.5. Vlnová délka detekce.....	60
4.1.6. Parametry analýzy při zvolených optimálních podmínkách.....	62
4.2. Úprava vzorku před vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.....	63
4.2.1. SPE Extrakce.....	63
4.2.2. Výtěžnost amoxicilinu.....	65
4.2.3. Výtěžnost ampicilinu.....	66
4.2.4. Výtěžnost penicilinu G (benzylpenicilinu).....	68
4.3. Reálné vzorky.....	69
4.3.1. Reálné vzorky na ČOV VFU Brno.....	74
4.3.2. Reálné vzorky na ČOV Brno-Modřice.....	78
<b>5. ZÁVĚR.....</b>	<b>80</b>
<b>6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....</b>	<b>81</b>
<b>7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....</b>	<b>88</b>
<b>8. SEZNAM ODBORNÝCH POJMŮ.....</b>	<b>89</b>
<b>9. SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>90</b>
<b>10. PŘÍLOHY.....</b>	<b>91</b>

## 1. ÚVOD

Množství vyrobených a spotřebovaných léčiv celosvětově narůstá. Mezi velmi často předepisovaná léčiva patří antibiotika, která jsou nedílnou součástí léčby bakteriálních infekcí. Jsou používána jak v humánní tak i veterinární medicíně.

S rostoucí spotřebou antibiotik roste i jejich výskyt v životním prostředí. Velká část použitých antibiotik (25 až 75 %) je z těla opět vyloučena v nezměněné formě. Takto se antibiotika dostávají do odpadní vody. Tyto látky jsou běžnými biologickými čistícími procesy velmi těžko odbouratelné. Jedná se o látky biologicky aktivní, které negativně ovlivňují bakteriální mikroflóru čistíren odpadních vod. Ta pak vykazuje nižší efektivitu procesu čištění. Antibiotika se tak dostávají do vyčištěné vody a tím i do životního prostředí.

Antibiotika pronikající do životního prostředí způsobují závažné problémy. Jedním z nich je vznik rezistence patogenních organismů vůči těmto látkám. Vzniku rezistence napomáhají nízké koncentrace antibiotik v prostředí.

Odpadní voda je hlavním zdrojem kontaminace životního prostředí těmito polutanty. Vývoj nových technologií pro odstranění těchto látek z odpadních vod je proto velmi důležitým úkolem. Zároveň roste potřeba analýz, které slouží k ověření účinnosti všech stupňů čištění v rámci čistícího procesu. Tyto analýzy musí být schopné stanovit i velmi nízké koncentrace antibiotik v odpadní i vyčištěné vodě.

V současné době lze přítomnost antibiotik v odpadní vodě stanovit několika metodami. Hlavní používanou metodou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie, dalšími metodami jsou pak plynová chromatografie a kapilární elektromigrační metody.



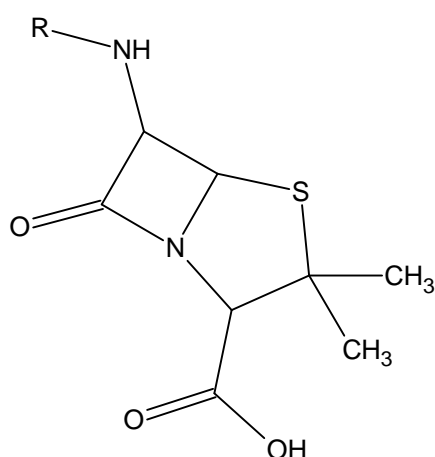
## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Antibiotika

Antibiotika jsou látky produkované bakteriemi nebo houbami, které již při velmi nízkých koncentracích tlumí růst jiných mikroorganismů, případně je usmrcují. Většina zvláště starších antibiotik má přirozený původ, novější jsou stále více vyvíjeny semisyntetickou nebo čistě syntetickou cestou. Antibiotika vyrobená synteticky se nazývají antimikrobní chemoterapeutika, nepovažuje se však za chybu, jestliže i tyto látky označíme jako antibiotika [1; 3; 4].

#### 2.1.1. Historie antibiotik

Objevování antibiotik probíhalo v několika časových etapách. První takové poznatky patří do historie antibiotik. Roku 1877 popsal L. Pasteur antagonistické působení některých anaerobních bakterií na růst bacilu *Bacillus anthracis* a poukázal na možnost využití tohoto poznatku v medicíně [2]. Účinek antibiotik popsali i čeští badatelé – mikrobiolog Honl a dermatolog Bukovský, kteří v roce 1898 publikovali práci o úspěšné léčbě 100 pacientů s bérčovými vředy lokálně přikládaným extraktem ze starších kultur *Bacillus pyocyaneus* [6]. Ani objev penicilinu Alexandrem Flemingem v roce 1928 však ještě neznamenal začátek masového používání antibiotik. Teprve práce Howarda Floreyho a Ernsta Chaina, které začaly v roce 1940 a ověřovaly Flemingovy nálezy, znamenají vstup do nové terapeutické éry. Zjistili, že penicilin, produkt plísně *Penicilium notatum*, má skutečně mohutný baktericidní efekt na pyogenní streptokoky. Soustředili se na vypracování takové kultivační metody, která by umožnila získat dostatečné množství penicilinu k léčbě lidí. K tomu došlo v roce 1941. Okamžitě byla zahájena průmyslová výroba penicilinu ve Velké Británii i v USA [6]. Tato dvojice vědců obdržela současně s Alexandrem Flemingem roku 1945 Nobelovu cenu za objev penicilinu a jeho léčivého účinku na různé infekční choroby [5].

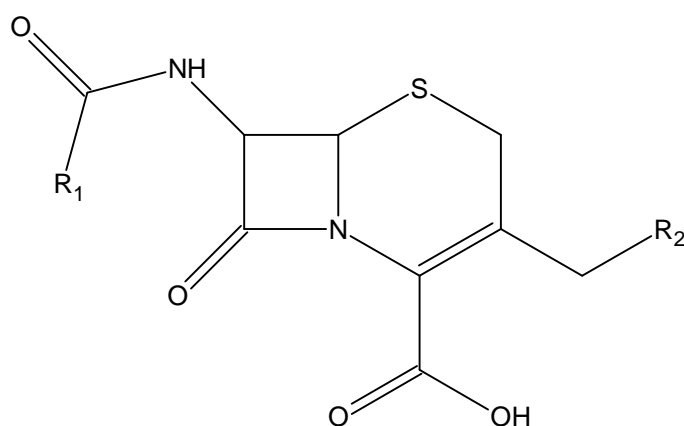


**Obrázek č. 1:** Substituovaná 6-aminopenicilanová kyselina [19].

Objev, že plísně mohou produkovat antimikrobiálně působící látky, vedl k rozsáhlému výzkumu všech v té době známých plísní i mikrobů. Během několika let byly takto získány stovky antibioticky působících látek. Ale jen málo z nich našlo terapeutické využití

v humánní medicíně. Mnohé z nich byly toxické nebo měly závažné nežádoucí účinky, u dalších bylo získání dostatečného množství značně obtížné a nákladné [6].

Proto farmaceutičtí biochemici usilovali o poznání struktury přirozených antibiotik, zdali není možné připravit je chemickou cestou levněji, nebo zda jejich modifikací nelze připravit látky s výhodnějšími nebo potřebnějšími vlastnostmi. Tím začala dosud trvající éra semisyntetických a syntetických antibiotik. V roce 1957 byla připravena kyselina 6-amino-penicilánová [Obr. 1], na jejíž volnou aminoskupinu bylo možné navazovat nové řetězce, čímž vznikaly peniciliny s novými vlastnostmi. Později byla objevena kyselina 7-amino-cefalosporánová [Obr. 2], která má více možných vazebných míst pro postranní řetězce. Na jejím základě bylo připraveno velké množství semisyntetických cefalosporinů [6].



*Obrázek č. 2: Substituovaná 7-aminocefalosporánová kyselina [19].*

## 2.1.2. Rozdělení antibiotik

### 2.1.2.1. Podle způsobu přípravy

- Přirozená antibiotika, která jsou přímo produkována příslušnými mikroorganismy.
- Semisyntetická antibiotika, která jsou připravována chemickou obměnou základní molekuly přirozeného antibiotika.
- Syntetická antibiotika, která jsou připravena podle struktury přirozeného antibiotika pouze chemickou syntézou [8].

### 2.1.2.2. Podle způsobu účinku

- Bakteriostatická antibiotika způsobují zastavení množení bakterií, přičemž exponované bakterie nejsou usmrceny. Bakteriostáza je děj reversibilní.
- Baktericidní antibiotika způsobují usmrcení bakteriálních buněk. Specifický význam má baktericidní účinek v průběhu prvních 4 hodin působení antibiotika. Je-li v tomto čase usmrceno nejméně 99 % všech exponovaných bakterií, pak můžeme hovořit o klinicky relevantní baktericidě. Baktericidní účinek je ireversibilní [1; 4].

**Tabulka č.1:** rozdělení antibiotik podle účinku [9]

<b>Primárně baktericidní antibiotika</b>	<b>Primárně bakteriostatická antibiotika</b>
peniciliny	chloramfenikol
cefalosporiny	tetracykliny
monobaktamy	makrolidy
karbapenemy	linkosamidy
aminoglykosidy	sulfonamidy
peptidy	imidazoly
glykopeptidy	glycylcykliny
ansamyciny	
nitroimidazoly	
fluorochinolony	
nitrofurantoin	
oxazolidinony	
streptograminy	

### 2.1.3 Mechanismus účinku

Jestliže se bakterie množí rychleji, než je mohou zničit vlastní obranné síly organismu, rozvine se infekční onemocnění. K terapii se užívají látky poškozující bakterie a bránící jejich dalšímu množení, které ale nemají nepříznivý vliv na vlastní tělesné buňky nemocného organismu. Specifické poškození bakterií je možné zejména v těch případech, pokud léčivo zasahuje do metabolického pochodu probíhajícího speciálně v bakteriálních buňkách, ne však v buňkách lidských. Zřetelné je to u inhibitorů syntézy buněčné stěny, protože buněčná stěna není u lidských buněk přítomná [10].

Antibiotika mohou tlumit růst bakterií nejrozličnějšími mechanismy a na mnoha místech v organismu [Obr. 3]. Mohou působit také více mechanismy najednou. Mechanismy účinku antibiotik lze rozdělit do několika skupin [1].

#### 2.1.3.1. Inhibice syntézy buněčné stěny

Bakteriální stěna je pevná zevní vrstva, úplně obklopující cytoplasmatickou buněčnou membránu. Udrží tvar bakteriální buňky a brání cytolýze, která by jinak vznikla jako následek vysokého osmotického tlaku uvnitř buňky, oproti podstatně nižšímu tlaku v zevním prostředí. Trojrozměrná struktura buněčné stěny je tvořena komplexním polymerem peptidoglykanem. Antibiotika inhibující syntézu buněčné stěny zabráňují vytvoření této trojrozměrné struktury. Takto vznikají defekty na buněčné stěně a vlivem osmotického tlaku dojde k cytolýze. Tímto mechanismem působí  $\beta$ -laktamová antibiotika, glykopeptidy a karbapenemy [Obr. 3] [19].

### **2.1.3.2. Poškození funkce cytoplasmatické membrány**

Cytoplasmatická membrána tvoří především osmotickou bariéru buňky. Ionty a metabolicky potřebné látky jsou pomocí této membrány koncentrovány uvnitř buňky. Antibiotika poškozující cytoplasmatickou membránu změni její propustnost a naruší tak iontovou rovnováhu. Dochází ke zpětnému, nekoordinovanému uvolnění iontů do prostředí. Z buňky unikají potřebné látky včetně nukleotidů. Proto poškození cytoplasmatické membrány vyvolává ireversibilní baktericidní efekt. Tímto mechanismem působí např. polypeptidy (polymyxin, bacitracin) [Obr. 3] [3; 7].

### **2.1.3.3. Porušení syntézy bílkovin**

Řada antibiotik zasahuje v různých fázích proteosyntézy bakteriální buňky [Obr. 3]. Mechanismus proteosyntézy začíná transkripcí jedné části dvoušroubovice DNA do formy mRNA. Pak následuje translace mRNA do molekuly proteinu, translace probíhá na ribosomech. K antibiotikům vyvolávajícím porušení syntézy bílkovin patří aminoglykosidy, chloramfenikol a tetracykliny [7].

Aminoglykosidy se po průniku do bakteriální buňky váží na ribozomy a způsobují tak tvorbu defektních proteinů. Tyto proteiny pak nejsou schopné plnit svoji enzymatickou či strukturální funkci. Účinek aminoglykosidů je relativně pomalý, protože než dojde k zastavení buněčné funkce, musí dojít ke značné kumulaci defektního proteinu [7].

Chloramfenikol blokuje na ribozomu enzym, který přenáší rostoucí peptidový řetězec k následující aminokyselině. Ta proto nemůže být připojena a tvorba proteinů se zastaví [7].

Tetracykliny blokují přístup aminokyselin k ribozomům, aminokyseliny tak nemohou být spojovány v proteiny [7].

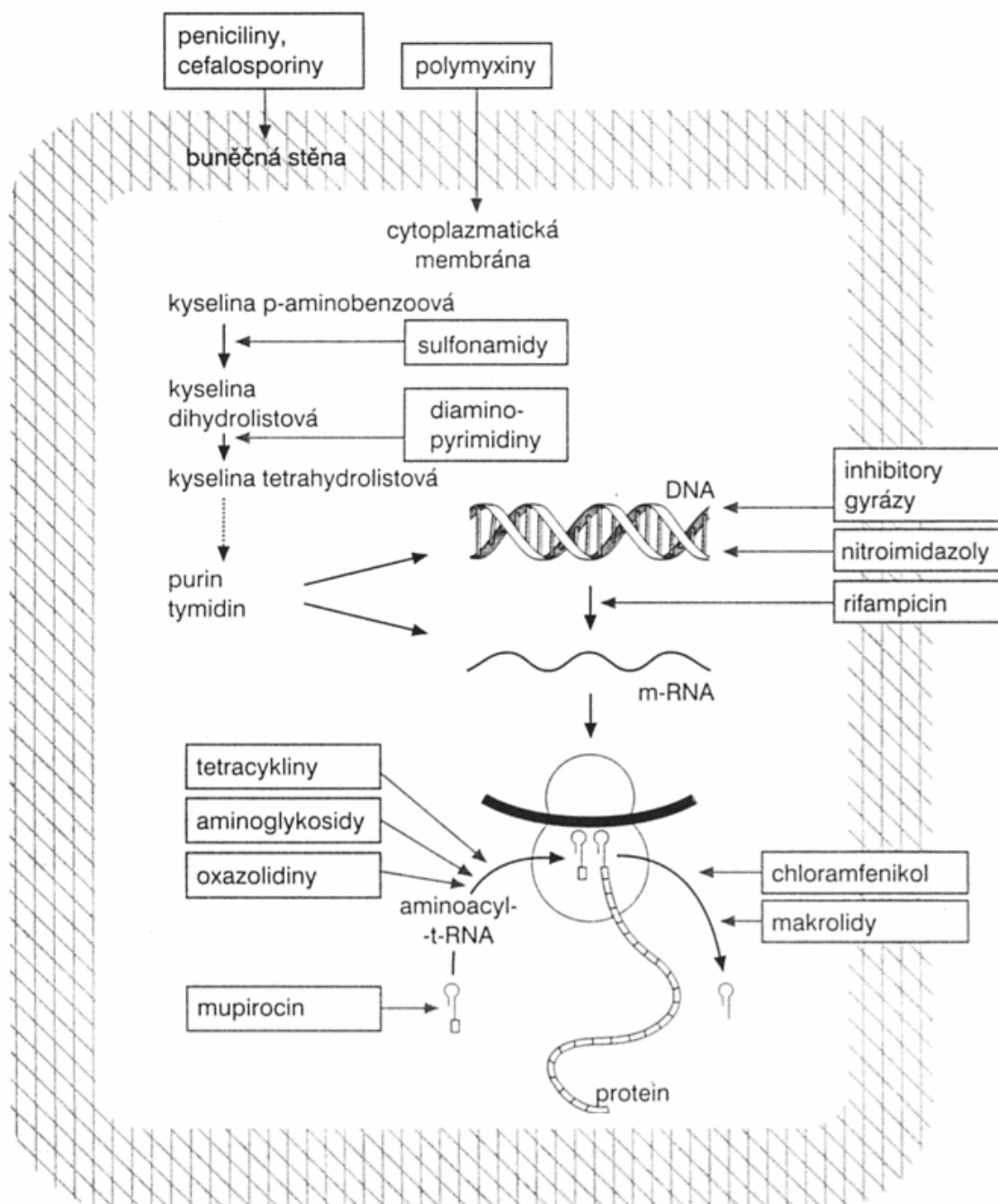
### **2.1.3.4. Porušení syntézy nukleových kyselin**

Látky porušující syntézu nukleových kyselin lze rozdělit do dvou skupin. První skupinou jsou inhibitory DNA-gyrázy. DNA-gyráza je bakteriální enzym důležitý pro zřetězení a rozvolnění DNA během replikace. Účinek antibiotik blokujiících DNA-gyrázu je specifický, protože eukaryocyty tento enzym nemají. Tímto mechanismem působí např. chinolonová antibiotika [3;11].

Druhým mechanismem je inhibice RNA – polymerázy [Obr. 3]. Vzhledem k tomu, že tento efekt má jen minimální rozdíl mezi buňkami bakteriálními a buňkami vyšších organismů, mají tyto preparáty poměrně značný stupeň toxicity. Tímto mechanismem působí např. rifampicin a fluorochinolony [7;11].

### **2.1.3.5. Kompetitivní inhibice**

Kyselina listová je důležitý koenzym, který se podílí na syntéze nukleových kyselin; je také nezbytná pro metabolismus bílkovin. Vyšší organismy nedovedou kyselinu listovou syntetizovat a jsou závislé na jejím přísunu zvenčí, zatímco bakterie si ji syntetizují samy. Nezbytnou součástí pro tvorbu kyseliny listové je kyselina p-aminobenzoová (PAB). Sulfonamidy, patřící do této skupiny, jsou PAB strukturně podobné a u bakteriálních buněk ji kompetitivně inhibují [Obr. 3]. Tím je blokováno zabudování kyseliny PAB do koenzymů kyseliny listové [7].



**Obrázek č. 3:** Místa působení antibiotik v buňce [16].

#### 2.1.4. Rezistence

Rezistence na antibiotika je podle definice Světové zdravotnické organizace schopnost bakteriální populace přežít účinek inhibiční koncentrace příslušného antibiotika [7]. Stupeň a rozsah rezistence je určován chemickou strukturou preparátu, skladbou bakteriální buňky a její schopností produkovat enzymy, které zapříčiňují destrukci antibiotika. Rezistence na antibiotika může být dvojího typu, primární (přirozená) nebo sekundární (získaná) [7].

Primární rezistence znamená přirozenou odolnost mikrobiálních druhů, která je podmíněna geneticky a nezávisí na tom, zda došlo k předchozímu kontaktu mikroorganismu s antibiotikem, či nikoliv [11].

Sekundární rezistence vzniká v průběhu nebo následkem předchozí antibiotické léčby. Vzniká nejčastěji při dlouhodobé a nekontrolované léčbě antibiotiky. Sekundární rezistence je v rezistentním jedinci geneticky zakotvena, dalším podáváním antibiotika jsou potlačeni citliví (dosud nerezistentní) jedinci. Dochází tak ke zvyšování rezistence celého bakteriálního kmene [11; 12].

Sekundární rezistence může vzniknout dvěma způsoby, fenotypickou adaptací nebo genetickými změnami.

Fenotypická adaptace je přizpůsobení bakterií na změněné metabolické pochody. Jsou to změny jen částečné a přechodné, lze je potlačit buď vyššími dávkami antibiotika nebo jeho úplným vysazením, čímž se obnoví původní metabolické pochody. Tento vznik rezistence k antibiotikům je relativně málo významný. Převažující vznik rezistence má genetický podklad [8].

Genetická rezistence může vzniknout modifikací genu na chromosomu, který je odpovědný za citlivost bakteriální buňky na antibiotikum (chromosomální rezistence) nebo převzetím genetického materiálu od rezistentních buněk. K tomu dochází nejčastěji přenosem genů, které jsou lokalizovány v plazmidech [8].

#### **2.1.4.1. Mechanismy rezistence**

*Produkce inaktivačních enzymů* – rezistentní kmeny produkují enzymy, které štěpí nebo substituují molekuly antibiotika a ty jsou pak neúčinné. Příkladem jsou  $\beta$ -laktamázy, enzymy štěpící  $\beta$ -laktámový kruh  $\beta$ -laktámových antibiotik.

*Změna v místě působení antibiotika* - dochází k pozměnění cílového receptoru, na kterém dochází k vazbě antibiotika.

*Impermeabilita* – antibiotikum se může transportovat do bakteriální buňky pomocí přenašeče. Změnou molekul přenašeče se zabrání průniku antibiotika do buňky.

*Metabolické změny* – metabolické děje atakované antibiotikem jsou v rezistentním mikroorganismu nahrazeny odlišnými metabolickými pochody.

*Mikroorganismus vytváří kompetitivního antagonistu antibiotika* – při kompetitivním působení antibiotika vytváří mikroorganismus zvýšené množství metabolitu vytěsňujícího antibiotikum [7;8;12].

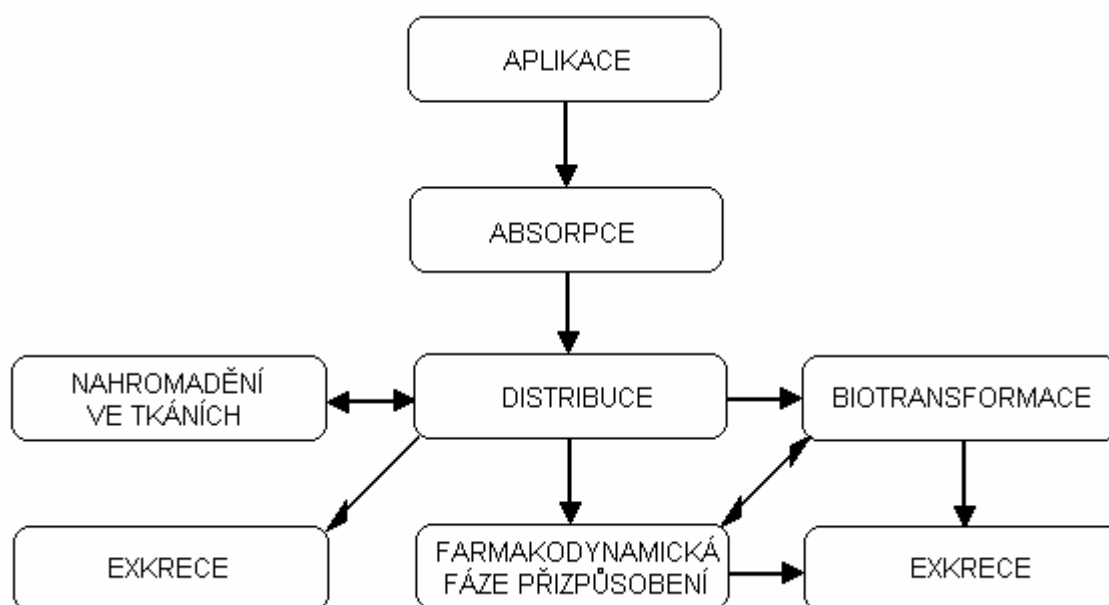
#### **2.1.4.2. Zkřížená rezistence**

Při styku s jedním antibiotikem může mikrobiální kmen získat rezistenci současně i vůči některým jiným antibiotikům, obvykle vůči látkám s příbuznou chemickou strukturou nebo s podobným mechanismem účinku. Klasickým příkladem jsou sulfonamidy; dojde-li k vývinu rezistence na jeden preparát, má získaná rezistence platnost i pro všechny ostatní sulfonamidové preparáty. Zkřížená rezistence může být oboustranná (mezi tetracykliny) nebo jednostranná (stafylokoky rezistentní vůči oxacilinu jsou vždy rezistentní vůči benzylpenicilinu, stafylokok rezistentní vůči benzylpenicilinu nebývá většinou rezistentní

vůči oxacilinu). Pokud je mikrobiální kmen rezistentní současně na 3 – 6 antibiotik, označujeme tuto rezistenci jako multirezistenci. Při rezistenci k více než 6 antibiotikům ji označujeme jako polyrezistenci [8;12].

### 2.1.5 Farmakokinetika

Farmakokinetika se zabývá osudem léčiva v organismu v závislosti na čase. Předmětem farmakokinetiky je studium místa a rychlosti vstřebávání (absorpce) léčiva, jeho transportu a rozdělení (distribuce) v organismu, jeho metabolické přeměny (biotransformace) a vyloučení z organismu [Obr. 4].



**Obrázek č. 4:** Schéma pochodu probíhajících v organismu po aplikaci léčiva [18].

#### 2.1.5.1. Absorpce a distribuce léčiv v organismu

Podané léčivo musí většinou projít z místa aplikace až k místu svého farmakologického účinku. Jestliže je léčivo podáno jinou cestou než intravenózně (do žíly), musí se nejprve absorbovat z místa podání do krve [17]. Nejčastější podání léčiva je perorální, kdy je léčivo resorbováno sliznicí trávicího ústrojí a poté přechází do krevního řečiště [10]. Předpokladem pro resorpci léčiva, jeho proniknutí do buňky a buněčných organel je jeho schopnost překonat fosfolipidovou dvojvrstvu biologické membrány. Fosfolipidy vytvářejí na základě svých amfifilních vlastností dvojvrstvu s hydrofilním povrchem a lipofilním nitrem. To je příčinou, že většina ve vodě rozpustných látek membránami neprochází. Prostup ostatních látek probíhá těmito mechanismy:

*Pasivní difuze* – probíhá ve směru koncentračního gradientu. Hnací silou určující prostup molekul je koncentrační rozdíl volné neionizované formy léčiva na obou stranách membrány. Pasivní difuze se děje vždy bez dodání energie [15].

*Aktivní transport* – na přenosu příslušné molekuly se podílí specifické membránové proteiny (přenašeče). Při přenosu vzniká komplex léčivo – přenašeč, který proniká membránou a poté se ve vnitřním prostředí buňky rozpadá zpět na přenašeč a transportované léčivo. Aktivní transport může probíhat bez dodání energie (ve směru koncentračního gradientu) i s dodávkou energie (proti směru koncentračního gradientu). Aktivní transport umožňuje transport léčiv, která by se vzhledem k nízkému rozdělovacímu koeficientu prostou difuzí do nitra buňky prakticky netransportovala [15].

Většina léčiv podávaných do organismu jsou slabé kyseliny nebo slabé báze, které se mohou v závislosti na pH prostředí vyskytovat v ionizované nebo neionizované formě. Struktura molekuly určuje, zda a v jakém prostředí zůstane léčivo natolik nepolární (liposolubilní), aby mohlo procházet lipidovou dvojvrstvou biologických membrán. Liposolubilitu neboli hydrosolubilitu léčiva charakterizuje hodnota disociační konstanty ( $pK_a$ ), tj. pH, při kterém je 50 % léčiva v ionizované podobě. Ionizovaná forma léčiva je hydrosolubilní a lipoidními membránami neprostupuje, zato se dobře rozpouští v polárním vodném prostředí krve a intersticiální tekutiny [15].

Distribuci léčiva, při níž dochází k přestupu léčiva z krevního řečiště do tkání a orgánů, ovlivňují fyziologické faktory, zejména krevní průtok, objem krve a biologické bariéry [15]. Koncentrace léčiva v jednotlivých tkáních a tělních tekutinách mohou být různě vysoké a mohou se lišit od příslušných koncentrací v séru. Jestliže je poměr mezi tkáňovými a sérovými koncentracemi nižší než 1:1, jako je tomu např. u penicilinů, cefalosporinů a aminoglykosidů, pak lze říci, že tato antibiotika pronikají především do extracelulární tekutiny. Jestliže je tento poměr vyšší než 2:1, jako je tomu např. u makrolidů, chloramfenikolu a tetracyklinů, lze předpokládat, že tato antibiotika do buněk pronikají [8].

Distribuce a osud léčiva v organismu z velké části závisí na jeho fyzikálně chemických vlastnostech, zejména na velikosti a tvaru molekuly, rozdělovacím koeficientu mezi vodnou a nepolární fází, liposolubilitě a acidobazických vlastnostech. Distribuce léčiv v organismu závisí i na vazbě na sérové bílkoviny, protože jen volná, na bílkoviny nevázaná léčiva jsou účinná a mohou pronikat do tkání. Důležitá je ale skutečnost, že tato vazba na sérové bílkoviny je reversibilní a slouží jako jakýsi rezervoár, ze kterého se léčivo může postupně uvolňovat [8].

#### **2.1.5.2. Biotransformace léčiv**

Léčiva nebo jiná xenobiotika vpravená do organismu mohou být vyloučena v nezměněné podobě (vysoce polární látky) nebo může dojít k jejich biotransformaci pomocí řady enzymů. Během biotransformace může dojít k jejich deaktivaci (biodegradace), nebo mohou být přeměněny na látky farmakologicky aktivnější (bioaktivace). Lipofilní látky jsou transformovány na produkty hydrofilnější, které jsou z organismu lépe vylučovány. Látky hydrofilní jsou z organismu vylučovány převážně v nezměněné formě [15].

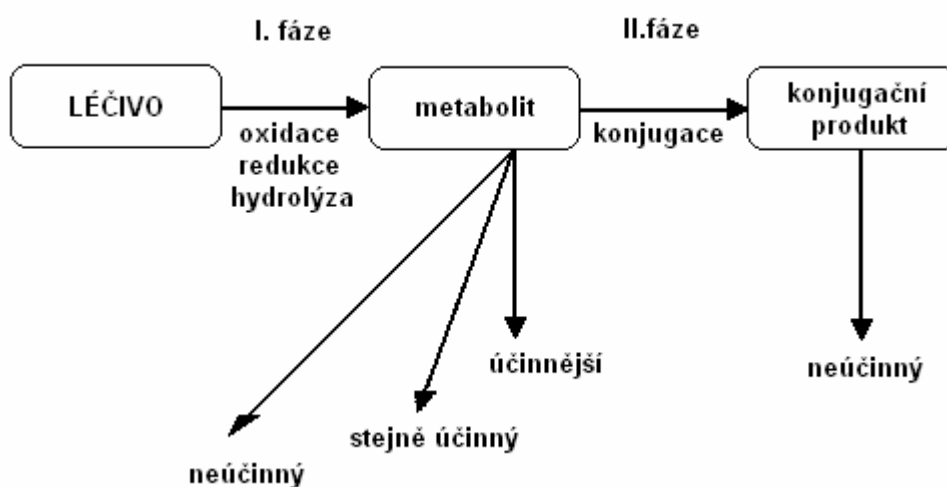
Biotransformace zahrnuje dvě fáze [Obr. 5]. Reakcemi první fáze jsou hydrolýza, redukce a oxidace. V první fázi biotransformace vzniká polárnější produkt, který poté podléhá konjugacím reakcím, tvořícím druhou fázi biotransformace. Mezi léčiva, která nepodléhají biotransformaci a z organismu se vylučují velmi rychle a v nezměněné podobě, patří aminoglykosidy nebo peniciliny [15].

V průběhu první fáze biotransformace dochází k zavedení polární funkční skupiny do základní molekuly léčiva. Jsou to především hydroxy- ( $-OH$ ), amino- ( $-NH_2$ ), merkapt- ( $-SH$ ), karbonylové ( $=CO$ ) a karboxylové ( $-COOH$ ) skupiny. Léčiva, obsahující již reaktivní



skupiny ve své molekule, nemusí podléhat první fázi biotransformace, ale mohou vstupovat ihned do procesu konjugace [15].

Druhá fáze biotransformace se nazývá konjugační nebo též syntetická. Dochází v ní k interakci vzniklého biotransformačního meziprojektu z první fáze s tzv. konjugačním činidlem. Konjugační činidlo je látka organismu vlastní, tj. endogenní látka tvořící přirozenou součást živého systému. Mezi endogenní látky, které se účastní konjugace, lze zařadit především glycin, glutamin, glutathion, kyselinu glukuronovou, kyselinu octovou a kyselinu sírovou. Vzniklý konjugát je zpravidla látka velmi polární, není schopen se reabsorbovat, a proto je vyloučen z organismu; výjimkou je pouze acetylce, která nevede ke vzniku polárnějších metabolitů. Mezi nejvýznamnější konjugační procesy patří glukuronidace (konjugace s kyselinou glukuronovou), sulfatace, acetylce a methylce [15].



**Obrázek č. 5:** Přehled biotransformačních fází ve vztahu k možným farmakodynamickým účinkům vzniklých metabolitů [20].

Biotransformační procesy mohou být ovlivněny řadou faktorů, například reversibilní vazbou léčiv na plasmatické proteiny nebo depotní vazbou léčiv ve tkáních. Dalšími faktory ovlivňujícími biotransformaci jsou věk a pohlaví, genetické predispozice, patologický stav nebo interakce mezi léčivy v průběhu biotransformace [15].

V časném novorozeneckém věku je aktivita biotransformačních procesů podstatně nižší, než je tomu u dospělého člověka. Ve stáří dochází ke snížení prokrvení jater, která jsou hlavním biotransformačním orgánem. Dochází tedy také ke snížení biotransformační aktivity. V řadě případů se biotransformační aktivita snižuje také v případě jaterních onemocnění. V průběhu biotransformace může docházet také k interakcím mezi léčivy. Některá léčiva mohou metabolickou enzymatickou aktivitu zvyšovat nebo snižovat, velmi často se tato změna metabolické aktivity promítá i do biotransformační přeměny jiných látek [15].

### 2.1.5.3. Exkrece léčiv

Definitivní bioeliminací léčiva, jako takového, nebo ve formě metabolitů, je jeho vyloučení z organismu. Kvantitativně nejvýznamnější úlohu ve vylučování většiny léčiv hrají ledviny. Větší množství léčiv je vylučováno také trávicím traktem (játry). Existují však i další mechanismy exkrece léčiv, na kterých se podílí plíce, mateřské mléko, sliny a pot. Avšak jejich podíl je v celkovém procesu exkrece zanedbatelný [15;20].

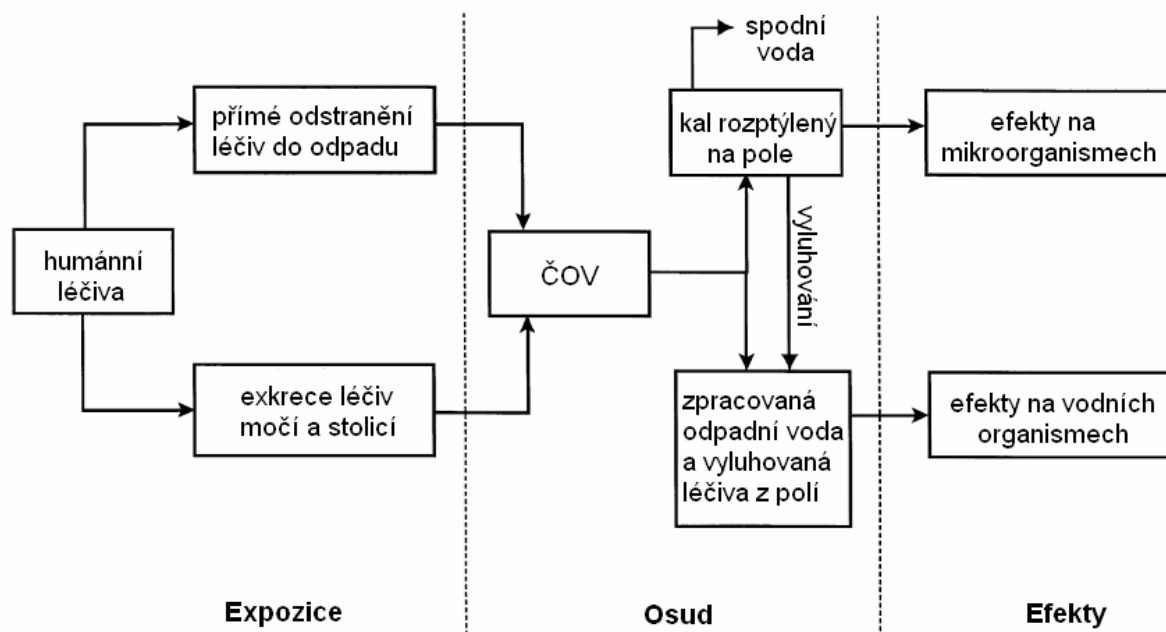
*Exkrece ledvinami* – nejprve vzniká prvotní moč, která má stejné složení jako krevní plasma, ale neobsahuje proteiny. Během průchodu systémem kanálků dochází k zahuštění prvotní moči vstřebáním vody. Přibližně 99 % vody je pasivně reabsorbováno zpět do krve. Dochází tak k výraznému zvýšení koncentrace vylučovaného léčiva, které může v důsledku koncentračního gradientu prostupovat zpět do krve. Ledvinami jsou odstraňovány mimo jiné i peniciliny. Jsou to polární léčiva, dobře rozpustná ve vodě. Z tohoto důvodu jsou velmi rychle odstraňována z organismu, i když je jejich koncentrace v definitivní moči mnohokrát vyšší, než je jejich koncentrace v krvi [15].

*Exkrece játry* – játra jsou vylučována zejména konjugáty s kyselinou glukuronovou, velmi zřídka jsou jimi vylučována nekonjugovaná léčiva. Mechanismem, kterým se játra na exkreci léčiv podílejí, je aktivní transport. Játra vytvářejí žluč, která obsahuje 10x vyšší koncentraci léčiv a jejich konjugátů než krev. Žluč je odváděna do tenkého střeva, ve kterém může docházet ke štěpení konjugátů léčiv a k jejich resorpci zpět do krve [15].

### **2.1.6. Cyklus antibiotik v životním prostředí**

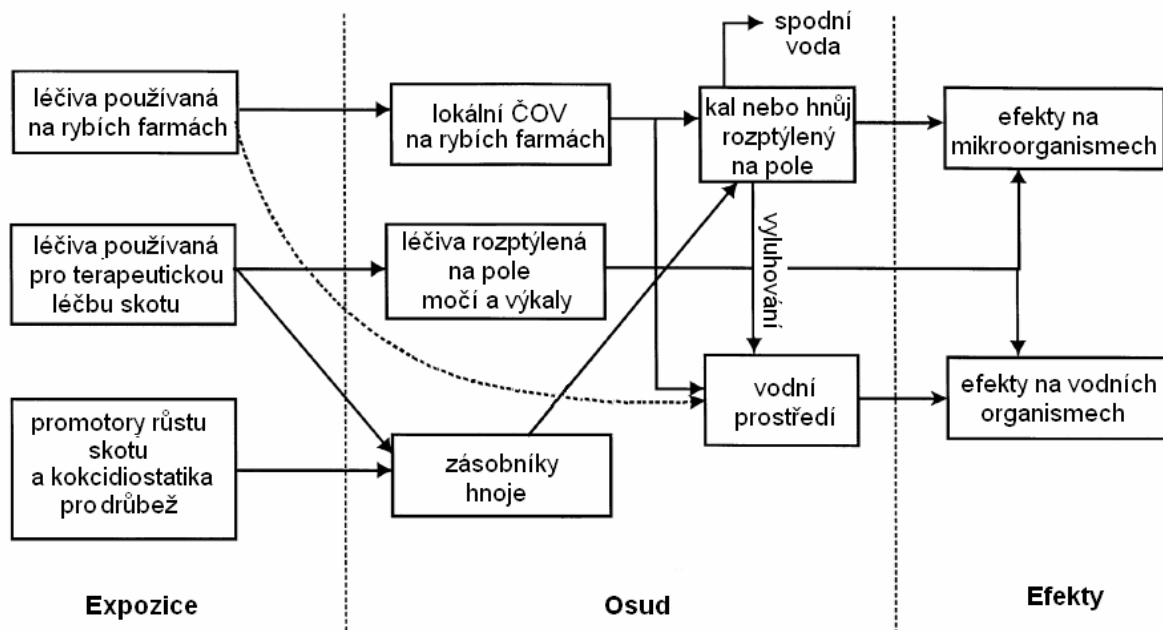
Výskyt léčiv v prostředí je v posledních letech jedním z problémů environmentální chemie [22]. Farmaka jsou označována jako nové kontaminanty životního prostředí. Během řady výzkumů, uskutečněných v několika zemích, bylo ve vodních ekosystémech objeveno více než 80 léčiv a jejich metabolitů [22]. Aplikace antibiotik je nedílnou součástí léčby bakteriálních onemocnění [24], proto tvoří široce používanou skupinu léčiv. Expoziční cesta, kterou se antibiotika do životního prostředí dostávají, souvisí s tím, zda se jedná o humánní nebo veterinární léčivo [21].

Humánní léčiva [Obr. 6] podléhají v organismu metabolickým a biotransformačním reakcím; 25 až 75% je však z organismu opět vyloučeno v nezměněné formě močí nebo fekáliemi [25]. Ve výkalech pacientů, kteří po 6 dní pravidelně užívali antibiotika, byla tato antibiotika také stanovena [23]. Takto se vyloučená farmaka dostávají do čistíren odpadních vod. Díky svým vlastnostem, jako je polarita, perzistence, rozpustnost ve vodě apod. jsou zde odstraněna pouze částečně [21]. Nepochopitelně lipofilní farmaka a jejich metabolity jsou zadržovány v čistírenském kalu. Pokud je tento čistírenský kal použit jako hnojivo na zemědělskou půdu, dostávají se léčiva do půdy, odkud mohou být vyluhována do spodních vod [27]. Polární farmaka a jejich metabolity nejsou v čistírenském kalu zadržovány a přechází do vyčištěné vody [21]. Dostávají se tak přímo do vodního ekosystému.



**Obrázek č. 6:** Cyklus humánních léčiv v životním prostředí [21].

Léčiva jsou používána také ve veterinární medicíně [Obr. 7], a to zejména při léčbě hospodářských zvířat a na rybích farmách, kde jsou rozptýlena zároveň s krmnou směsí přímo do vody [21;27]. Léčiva, která nejsou rybami spotřebována, se dostávají přímo do vodního ekosystému. Farmaka podávaná hospodářským zvířatům se dostávají do prostředí společně s výkaly a močí a to buď přímo nebo při aplikaci hnoje nebo močůvky na pole jako hnojiva [29]. Poslední skupinou veterinárních léčiv jsou promotory růstu; tyto přípravky však již nejsou v České republice používány, v Evropě je jejich používání silně redukováno, nejvíce se dosud používají v USA [28].



**Obrázek č. 7:** Cyklus veterinárních léčiv v životním prostředí [21].

Dalším zdrojem antibiotik v životním prostředí jsou odpadní vody z farmaceutického průmyslu. Tyto odpadní vody obsahují vysoké koncentrace účinných látek. Biologický stupeň

čištění má v tomto případě velmi nízkou účinnost a proto je u těchto typů odpadních vod nutná chemická předúprava [30].

Polární farmaka jsou obsažena hlavně ve vodním prostředí, zatímco nepolární jsou zadržována v sedimentech, kalcích a půdě [22]. Zda a v jaké míře bude léčivo zadržováno v půdě, nebo zda bude přecházet do vodního prostředí, je často neodhadnutelné díky množství funkčních skupin (karboxylové a aldehydové skupiny, aminoskupiny) v molekule této látky [21;29]. Díky funkčním skupinám závisí míra zadržování léčiva v půdě a pevných matricích také na pH prostředí a tvorbě komplexu léčivo – pevná fáze [21]. Distribuce léčiv mezi pevné fáze a vodu se vyjadřuje ve formě distribučního koeficientu  $K_D$ , který je definován jako poměr koncentrace látky sorbované na pevné částice a koncentrace v roztoku po ustavení rovnováhy [31;32].

Mezi antibiotika nejvíce se objevující ve vzorcích životního prostředí patří makrolidy, fluorochinolony a sulfonamidy. Naopak tetracykliny a peniciliny nebývají ve vzorcích životního prostředí nalezeny, nebo jsou přítomny jen v nízkých koncentracích [31]. To je způsobeno chemickou nestabilitou  $\beta$ -laktámového kruhu (peniciliny), který je vysoce citlivý na pH, teplotu a působení enzymů  $\beta$ -laktamázy [33].

Antibiotika přítomná v životním prostředí působí na živé organismy dvěma efekty:

*Toxikologický efekt* – pozorovaný u všech xenobiotik. Jeho účinky se mohou projevit na několika hladinách biologické hierarchie (buňky, orgány, organismy, populace, ekosystémy). Látky patřící svými efekty do této skupiny jsou hodnoceny zároveň s jinými xenobiotiky [21].

*Genetická selekce* – vysoká míra užívání antibiotik v posledních 50 letech způsobuje genetickou selekci více zhoubných bakterií. Genetický fond přirozených mikroorganismů je tím významně pozměněn a ty potom vykazují odolnost i vůči velmi vysokým dávkám antibiotik. Tento efekt je dlouhodobý a ireverzibilní a je označován za hlavní příčinu zvyšující se bakteriální rezistence. Genetická selekce mikroorganismů je podporována nízkými koncentracemi antibiotik v prostředí [21;34].

### 2.1.7. Léčiva v čistírnách odpadních vod

Jak již bylo řečeno v předcházející kapitole, antibiotika podléhají v organismu metabolickým a biotransformačním reakcím. Velká část použitých antibiotik je však z organismu v původní formě vyloučena. Tato antibiotika se poté dostávají na čistírnu odpadních vod. Jejich eliminace však neprobíhá efektivně a antibiotika se dostávají do vyčištěné vody. Čistírny odpadních vod proto představují významný bodový zdroj emisí [40]. Obsah antibiotik ve vyčištěné vodě se pohybuje v rozmezí  $\text{ng.l}^{-1}$  až  $\mu\text{g.l}^{-1}$  [37].

K odstraňování antibiotik dochází v biologickém stupni čištění (aktivaci) [40]. Uplatňují se zde biochemické procesy, podmíněné činností mikroorganismů (aktivovaný kal), které rozkládají organické látky obsažené ve vodě [38]. Aktivovaný kal je směsná kultura mikroorganismů, většinou bakterií. Nejčastěji se v aktivovaném kalu vyskytují následující rody: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Chromobacterium*, *Azotobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium*), *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Lophomonas* aj. [39]. V aktivovaném kalu se mohou v menším množství vyskytovat také houby, plísňe, kvasinky a také vláknité mikroorganismy, např. *Leptomit*, *Leucotrix*, *Nocardia*, *Beggiatoa*, *Flexibacter* a další [39].

Antibiotika jsou látky se specifickým biologickým účinkem na mikroorganismy. Pokud nejsou po použití v organismu biotransformována, zachovávají si i po vyloučení tento svůj účinek a působí na mikroorganismy v biologickém stupni čištění a způsobují jejich eliminaci [21;22;23;27;29;31;43].

Většina léčiv je na čistírnách odpadních vod odstraněna ze 60 až 90% [23;26]. Zda a v jakém množství bude antibiotikum nebo jeho metabolit na čistírně odpadních vod odstraněno, závisí především na jeho vlastnostech, jako např. na polaritě a rozpustnosti ve vodě. Polární antibiotika a metabolity přechází do vyčištěné vody [21]. Nepochopitelně lipofilní antibiotika a jejich metabolity jsou sorpcí zadržovány v čistírenském kalu [27]. Pokud je tento kal aplikován na pole, dostávají se antibiotika do půdy a mohou být vyluhována do podzemních vod nebo spláchnuta při deštích do povrchových vod [27]. Obsah organických látek i léčiv může být v čistírenském kalu snížen anaerobním vyhníváním [41].

Metody, které by úplně odstranily léčiva z odpadní vody se teprve rozvíjejí. Při odstraňování léčiv z vody by mohla být účinná membránová filtrace nebo ozonizace [30].

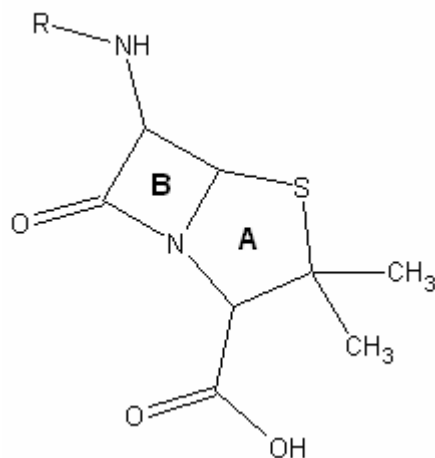
## 2.2. Peniciliny

Peniciliny tvoří širokou skupinu látek, jejichž společnými vlastnostmi jsou shodný mechanismus účinku, baktericidní působení na množící se mikroorganismy, dobrá tolerance, nízká toxicita a poměrně krátký postantibiotický efekt [5].

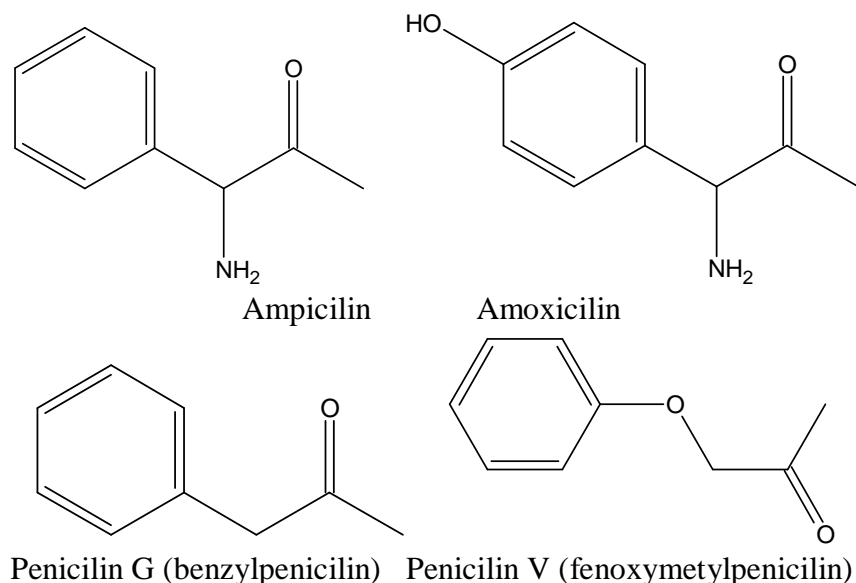
Nové deriváty penicilinů mají nejen výhodné farmakokinetické účinky, ale také rozšířené protiinfekční spektrum účinku. Jsou proto dosud nejčastěji předepisovanými protiinfekčními látkami [3].

### 2.2.1. Struktura

Peniciliny patří do skupiny  $\beta$ -laktamových antibiotik. Jejich základní chemickou strukturu [Obr. 8] tvoří thiazolidinový kruh (A), připojený k  $\beta$ -laktamovému kruhu (B), na který je navázána sekundární aminoskupina (RNH-). Na aminoskupinu mohou být připojeny rozdílné substituenty [Obr. 9] [19].



**Obrázek č. 8:** Základní struktura penicilinových antibiotik [19].



**Obrázek č. 9:** Postranní řetězce některých penicilinů [19].

### 2.2.2. Rozdělení penicilinů

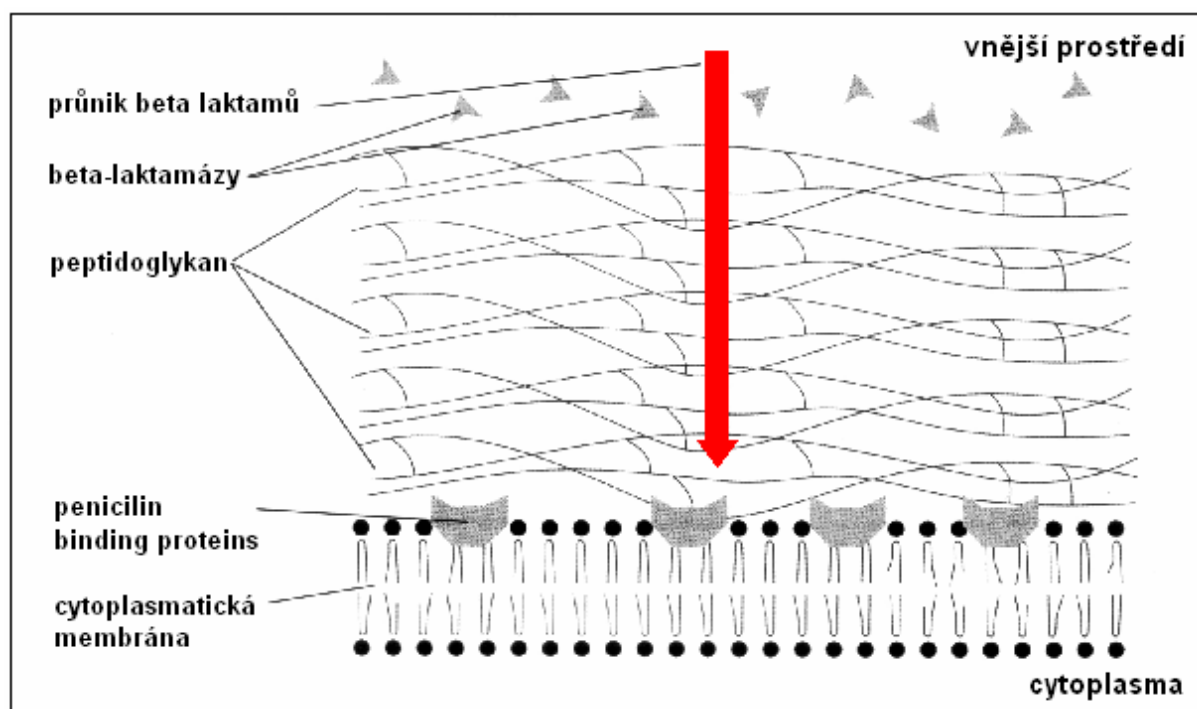
Spektrum účinku je přehled bakteriálních druhů, na které antibiotikum přirozeně účinkuje. Podle spektra účinku můžeme peniciliny rozdělit na:

*Úzkospektré* – používají se k léčbě infekcí způsobených známými původci (penicilin G, penicilin V) [1].

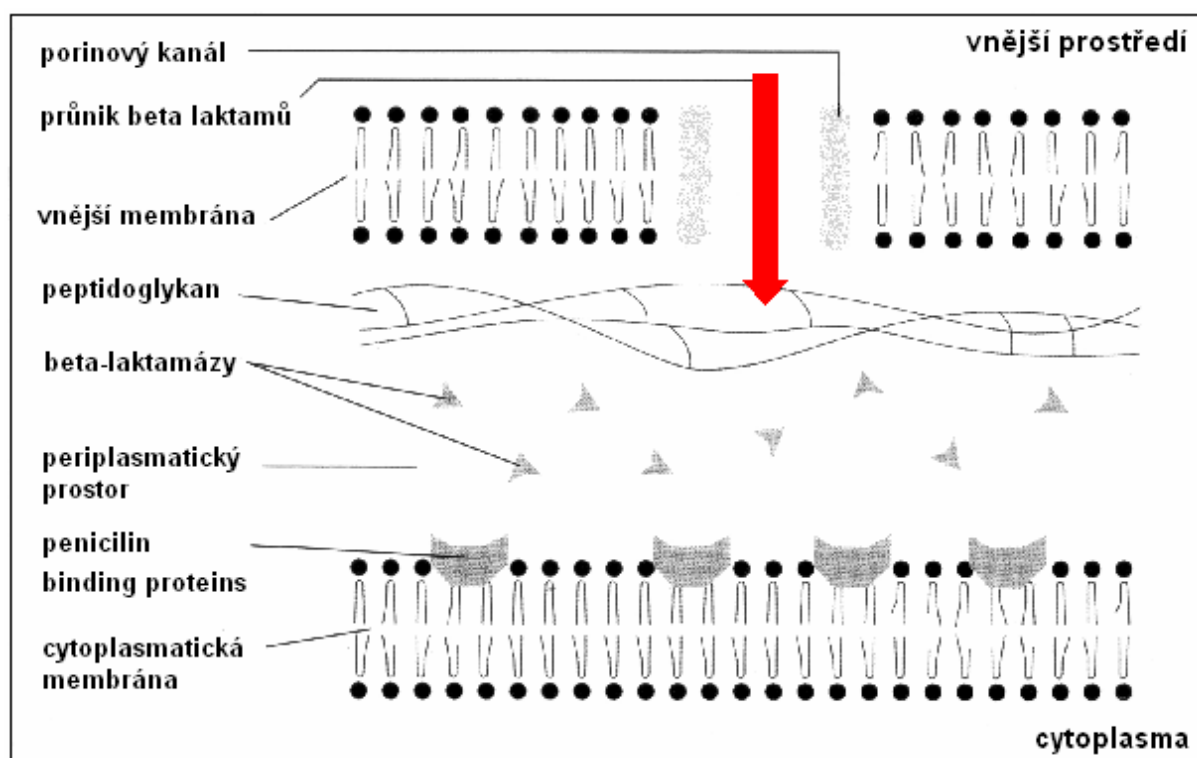
*Širokospektré* – používají se k léčbě infekcí, kdy původce není znám nebo při smíšené infekci (ampicilin, amoxicilin) [1].

### 2.2.3. Mechanismus účinku penicilinů

Mechanismus účinku penicilinových antibiotik spočívá v inhibici tvorby buněčné stěny bakterií. Buněčná stěna je struktura rozmanité stavby a různého stupně složitosti. Stavba buněčné stěny rozhoduje o způsobu barvení podle Grama a rozlišuje pak mikroorganismy grampozitivní (G+) a gramnegativní (G-). Grampozitivní bakterie [Obr. 10] mají kromě plazmatické membrány ještě silnou buněčnou stěnu tvořenou mnoha vrstvami peptidoglykanů; tím je způsobeno jejich intenzivnější barvení podle Grama. Gramnegativní bakterie [Obr. 11] mají jen tenkou vrstvu peptidoglykanů a prostor mezi plazmatickou membránou a zevní fosfolipidovou dvouvrstvou je oddělen tzv. periplazmatickým prostorem, kde se hromadí degradační enzymy  $\beta$ -laktamázy. [3; 5].



**Obrázek č. 10:** Schematické znázornění stavby stěny grampozitivní bakterie [14].

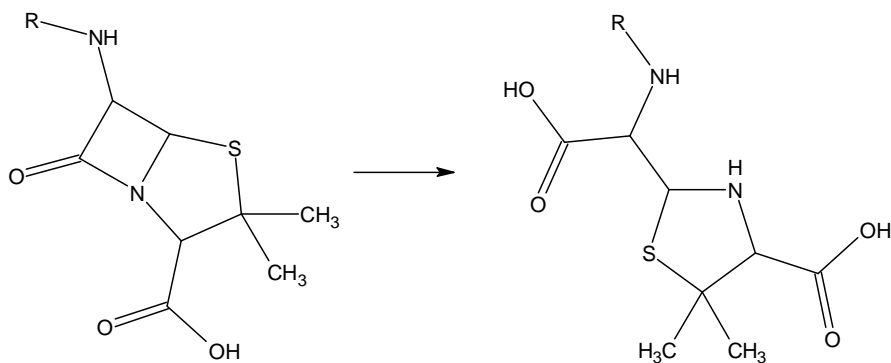


**Obrázek č. 11:** Schematické znázornění stavby stěny gramnegativní bakterie [14].

Peniciliny brání vytvoření trojrozměrné struktury buněčné stěny bakterií. Peptidoglykanová vlákna, která tvoří buněčnou stěnu, jsou do trojrozměrné struktury spojována působením enzymů (transpeptidázy, transglykosidázy, karboxypeptidázy).  $\beta$ -laktámová antibiotika se vážou na specifická vazebná místa (PBP, „penicilin binding protein“), čímž inhibují právě tyto enzymy. Vznikají tak buňky s poškozenou buněčnou stěnou, které nejsou

schopné odolávat osmotickému tlaku, který je uvnitř bakterií vysoký. To nakonec vede k lýze bakteriální buňky nebo jsou takto poškozené buňky zlikvidovány buňkami hostitele [3; 5].

Peniciliny působí na bakteriální buňky pouze v době jejich růstu a množení, kdy dochází k tvorbě buněčné stěny. V klidovém stádiu, kdy již mají buněčnou stěnu vybudovanou, je účinek na bakteriální buňky malý. Obecně lze konstatovat, že gramnegativní bakterie jsou daleko odolnější k působení penicilinů než grampozitivní bakterie. To je způsobeno tím, že v periplazmatickém prostoru gramnegativních bakterií jsou nahromaděny  $\beta$ -laktamázy. To jsou enzymy, které rozkládají řadu penicilinů rozštěpením  $\beta$ -laktamového kruhu [Obr. 12]. Výsledný produkt štěpení, penicilová kyselina již antibakteriální účinnost nemá [3;19].  $\beta$ -laktamový kruh je velmi citlivý také na pH, teplotu a je hydrolyzován i ionty kovů [33;43].



**Obrázek č.12:** Enzymatické rozštěpení  $\beta$ -laktamového kruhu  $\beta$ -laktamázami [42].

#### 2.2.4. Inhibitory $\beta$ -laktamáz

Inhibitory  $\beta$ -laktamáz jsou látky, které se ireverzibilně váží na aktivní místa  $\beta$ -laktamáz.  $\beta$ -laktamázy k nim mají mnohem vyšší aktivitu než k  $\beta$ -laktamovým antibiotikům. Je-li současně s  $\beta$ -laktamovým antibiotikem podán inhibitor  $\beta$ -laktamázy, např. při infekci gramnegativními mikroby, potom jsou  $\beta$ -laktamázy ireverzibilně inaktivovány vazbou na inhibitor a antibiotikum může účinně působit na patogeny.

Inhibitory  $\beta$ -laktamáz zahrnují dvě skupiny. Jsou to buď látky bez antibiotické účinnosti, do této skupiny patří kyselina klavulanová, nebo látky s omezenou antibiotickou aktivitou. Do této skupiny patří sulfony kyseliny penicilanové (sulbaktam a tazobaktam) [5;8].

#### 2.2.5. Farmakokinetika penicilinů

Farmakokinetika penicilinů je charakterizována poměrně dobrým průnikem do biologických tekutin (krev, intersticiální tekutina) a malým průnikem do buněk. Biologický poločas penicilinů je krátký, kolem 1 hodiny. Vylučování penicilinů je zajišťováno převážně ledvinami [13].

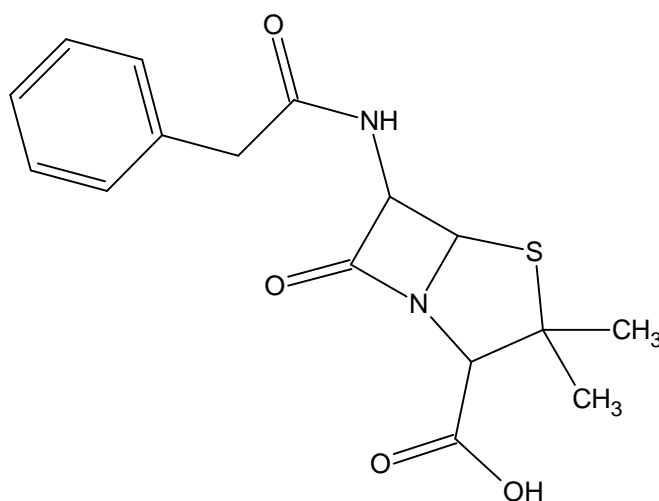


## 2.2.6. Nežádoucí účinky penicilinů

Peniciliny mají výborný bezpečnostní profil, jsou velmi málo toxické. Jedinou klinicky podstatnou nevýhodou je riziko reakce z přecitlivělosti, především ve formě dermatologických alergických projevů. Nejčastěji se objevuje kopřivka nebo jiné vyrážky, existuje však také riziko vzniku podstatně závažnějších alergických reakcí, včetně anafylaktického šoku [13].

## 2.3. Charakteristika vybraných penicilinů

### 2.3.1. Penicilin G (benzylpenicilin)



**Obrázek č. 13:** Penicilin G [19].

Penicilin G [Obr. 13] byl prvním penicilinovým antibiotikem zavedeným do klinické praxe (počátkem čtyřicátých let). Je to velmi dobře rozpustný parenterální penicilin s krátkým eliminačním poločasem (podávání každých 4 – 6 hodin). Ze žaludku se špatně vstřebává, navíc je nestabilní v jeho kyselém prostředí. Je rozkládán penicilinázou a dalšími  $\beta$ -laktamázami bakterií. Je dobře účinný proti streptokokovým a meningokokovým infekcím (tonsilitida, erysipel, endokarditida, meningokoková i pneumokoková meningitida, plynatá sněť, kapavka, syfilis) [5].

Malé množství penicilinu G je metabolizováno v játrech, avšak 60 – 90 % je eliminováno tubulární sekrecí (ledvinami) [5].

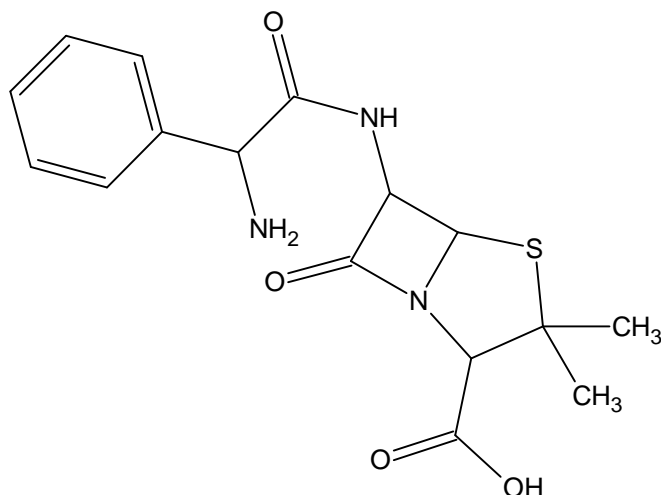
Penicilin G je dostupný ve třech formách:

*Krystalický benzylpenicilin* – ve formě sodné nebo draselné soli, dobře rozpustný ve vodě pro intravenózní aplikaci [36].

*Prokain-benzylpenicilin* – ve vodě těžko rozpustná sůl, používá se ve formě suspenze (intramuskulární aplikace). Prokain zvyšuje velikost molekuly a tím prodlužuje absorpci i přetrvávání plazmatických koncentrací [36].

*Benzathin-benzylpenicilin* – ve vodě velmi těžko rozpustná sůl, používá se ve formě suspenze (intramuskulární aplikace). Velmi pomalu se absorbuje, dosahuje nízkých plazmatických koncentrací, které dlouho přetrvávají (až 10 dní) [36].

### 2.3.2. Ampicilin



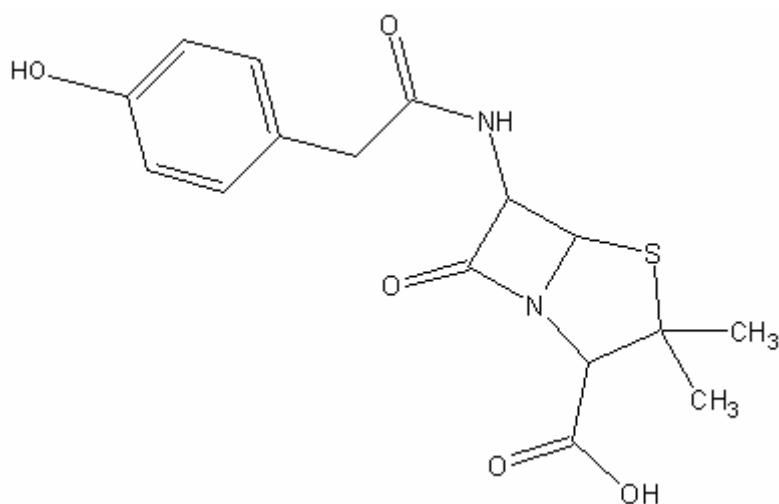
**Obrázek č. 14:** Ampicilin [19].

Ampicilin [Obr.14] je polosyntetické širokospektré penicilinové antibiotikum, poprvé připravené v roce 1961. Může se podávat perorálně i parenterálně (intravenózně, intramuskulárně). Je rozkládán celou řadou  $\beta$ -laktamáz, proto se v poslední době mnohem častěji podává jeho kombinace s inhibitory  $\beta$ -laktamáz (kyselina klavulanová, sulbaktam a tazobaktam) [4].

Oproti penicilinu G je účinek ampicilinu rozšířen i na skupinu gramnegativních bakterií. Používá se při léčbě hemofilových infekcí (s prokázanou citlivostí), enterokokových infekcí a listeriozy [36].

Ampicilin je vylučován převážně ledvinami. Do 6 hodin se vyloučí asi čtvrtina podané dávky [4].

### 2.3.3. Amoxicilin



**Obrázek č. 15:** Amoxicilin [19].

Amoxicilin [Obr.15] je polosyntetické širokospektré penicilinové antibiotikum, velmi blízké ampicilinu. Podává se perorálně. Amoxicilin není odolný vůči  $\beta$ -laktamázám, proto není účinný na ty organismy, které  $\beta$ -laktamázy produkují. Amoxicilin se podobně jako ampicilin někdy kombinuje s látkami inhibujícími  $\beta$ -laktamázy, např. s oxacilinem pro zmenšení rozkladu bakteriálními  $\beta$ -laktamázami, nebo s aminoglykosidovými antibiotiky pro rozšíření spektra a zesílení intenzity účinku [5;12;13].

Amoxicilin se používá při léčbě hemofilových infekcí (s prokázanou citlivostí), enterokokových infekcí, listeriozy, infekcí močových cest, zánětů žlučových cest a bronchitidy [36].

## **2.4. Metody stanovení léčiv**

### **2.4.1. Odběry vzorků z čistíren odpadních vod**

Správný způsob odběru reprezentativního vzorku je základní podmínkou pro úspěšné provedení všech potřebných analýz, kterým má být tento materiál podroben a rovněž pro získání správných výsledků. Odebraný vzorek odpadní vody musí mít průměrné vlastnosti, složení i další charakteristické znaky. Špatně provedený odběr vzorku může být příčinou zkreslení či úplného znehodnocení konečného výsledku analýzy [45].

Typická místa odběrů vzorků odpadní vody jsou přítok a odtok z čistírny odpadních vod (ČOV). Mnoho pozorovatelů větších čistíren zároveň odebírá vzorek i v průběhu procesu čištění, případně na kanalizační síti. Vhodným místem pro získání informací cenných pro řízení procesu čištění je přítok na aktivaci [44].

Opadní voda na přítoku na ČOV je značně nehomogenní médium. Zejména je-li více přítoků různé kvality, musíme být opatrní při výběru vhodného místa pro odběr vzorku. To platí, ať už odebíráme ručně nebo automatickým vzorkovačem. V současné době stále větší množství provozů využívá automatických vzorkovačů. Jejich výhodou je zejména v opakovatelnosti a také v možnosti odebírat nepřetržitě a v přesně daných intervalech [44].

Pro vzorkování uvnitř procesu čištění odpadní vody je často využíván směsný vzorek. Rozborem však získáme pouze údaje o průměrných hodnotách parametrů v daném dni. Pro potřeby řízení procesu čištění je rozhodně lepší odebírat vzorky dělené, na kterých je dobře vidět vývoj jednotlivých hodnot v různých denních i nočních hodinách [44].

Na odtoku z ČOV je voda čistá, proto se může z pohledu kvality vody zdát vzorkování na odtoku jako nejméně problematické. Odtok z ČOV však může také představovat problém. Zejména jde-li o menší ČOV, kde odtéká pouze malé množství vody, případně je užíváno diskontinuální vypouštění [44].

Pro odběr vzorků se většinou používají skleněné a plastové vzorkovnice. Někteří výrobci nabízejí i jednorázové vaky, které jsou výhodné zejména při vzorkování vod obsahujících prioritní polutanty, kde dekontaminace vzorkovnic je časově i finančně náročná. U skleněných vzorkovnic je potřeba dbát na kvalitu skla. Ne všechny „skleněné“ nádoby lze použít pro laboratorní účely [44].

Každá vzorkovnice by měla být označena štítkem, aby nemohlo dojít k záměně. Transportujeme-li odebrané vzorky na delší vzdálenost, nastává (zejména v letních měsících) problém s chlazením vzorků během přepravy. Vzorky musí být udržovány při teplotě 4°C nejen při odběru, ale také při přepravě. Některé vozy jsou pro tyto účely vybaveny chladicími boxy. Ještě lepší variantou jsou mobilní vzorkovače s chlazením, které je možné napojit na napájení v automobilu a pokračovat tak v aktivním chlazením vzorku až do doby, kdy je

předán laboratoři ke zpracování. Některé parametry jsou velmi náchylné na teplotní degradaci; takový vzorek může mít naprosto jiné hodnoty [44]. Dalšími příčinami změn vlastností vzorku může být působení světla, oxidace vzorku vzdušným nebo rozpuštěným kyslíkem, změna oxických poměrů po spotřebování kyslíku, absorpce CO<sub>2</sub> z ovzduší do vzorku, mikrobiologické procesy, vysrážení, vymrznutí nebo odpaření analytů [55].

## 2.4.2. Úprava vzorku

Nejprve musí být ze vzorků odpadní vody odstraněna suspendovaná hmota. K tomu se používá filtrace nylonovými membránovými filtry (0,45 µm) [47;48] nebo křemennými filtry (0,4 µm) [43]. Před filtrací vzorků vody z přítoku na ČOV je možné použít centrifugaci při nízkých teplotách [43].

Pokud se nepřistupuje okamžitě k extrakci, musí být vzorky uloženy v chladu (4°C) a ve tmě. Nejsou-li vzorky konzervovány, měla by analýza proběhnout do 12 [43] až 24 [48] hodin po vzorkování. Pokud není možné analýzu v takto krátkém časovém intervalu provést, mohou být vzorky konzervovány přidávkou 1% roztoku formaldehydu a skladovány v temnu a 4°C až do provedení analýzy [46].

Dalším krokem úpravy je extrakce nebo lyofilizace. Extrakce se používá k přečištění a zakoncentrování vzorku. Existují různé druhy extrakce, extrakce tuhou fází, mikroextrakce tuhou fází, extrakce z kapaliny do kapaliny, extrakce plynem, mikrovlnná extrakce. Při stanovení penicilinových a β-laktamových antibiotik je používána extrakce tuhou fází [33;43;45;47;48;49;50;51;52;60].

### 2.4.2.1 Extrakce tuhou fází (SPE)

Extrakce tuhou fází (SPE – *Solid Phase Extraction*) je technika přípravy vzorků, jejíž význam stále roste. Při použití SPE se lze vyhnout řadě problémů, které jsou již tradičně spojovány s další metodou přípravy vzorků, s extrakcí kapalina-kapalina. Nejdůležitější výhodou oproti extrakci kapalina-kapalina je snížení spotřeby organických rozpouštědel, která jsou často řazena mezi látky jedovaté, ničící ozonovou vrstvu, ale i jinak nebezpečné [53].

SPE je nejčastěji používána při zpracování kapalných vzorků, především pro extrakci středně těkavých a netěkavých látek, jejich zakoncentrování a odstranění nežádoucích látek rušících následná analytická stanovení [54].



**Obrázek č. 16:** SPE kolonky se sorbentem [54].

Princip extrakce tuhým sorbentem spočívá v tom, že roztok analytu ve vodě se přivede do kontaktu s tuhým sorbentem, který silně sorbuje analyt, ale co nejméně ostatní složky roztoku. Po oddělení sorbentu od roztoku je zachycený analyt uvolněn buď zahřátím nebo elucí rozpouštědlem. K extrakci tuhým sorbentem lze použít jak uspořádání statické, tj. míchání roztoku analytu se sorbentem a následné odfiltrování sorbentu, tak i uspořádání dynamické. V tomto provedení je sorbent uložen v kolonkách z polypropylenu nebo ze skla [Obr. 16] a nebo je slisován se skleněnými vlákny do disků [Obr. 17]. Průtok vzorku je umožněn buď gravitací, pozitivním tlakem (čerpadlem, injekční stříkačkou), nebo negativním tlakem (připojeným vakuem). V současných aplikacích převládá dynamické uspořádání [54;56].



**Obrázek č. 17:** SPE disky [54].

Princip sorpce je obdobný jako u kapalinové chromatografie, a proto i používané sorbenty jsou velice podobné. Používají se chemicky obrácené vázané fáze na bázi silikagelu, normální fáze a iontově výměnné fáze, ale i celá řada dalších sorbentů [54].

SPE extrakce se skládá z několika kroků [Obr. 18]:

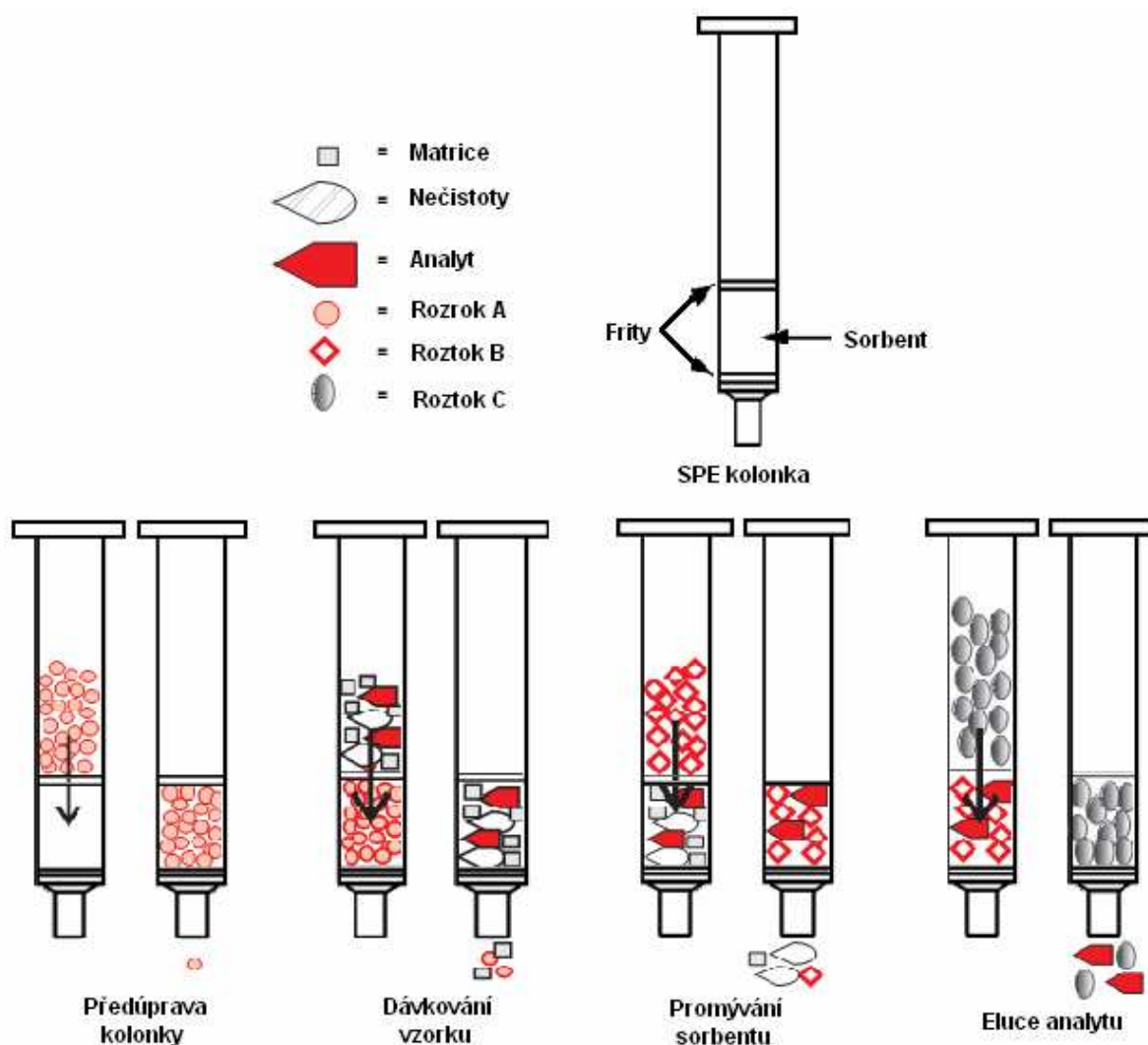
*Předúprava (kondicionace) kolonky* – příprava kolonky na interakci složek vzorku s pevnou fází. Sorbent na bázi silikagelu s navázanými nepolárními řetězci má hydrofóbní vlastnosti; aby extrahoval sloučeniny z vody, musí být aktivován. K aktivaci jsou užívána organická rozpouštědla, nejčastěji methanol [48;49;57]. Přebytek použitého rozpouštědla je poté odstraněn propláchnutím kolonky rozpouštědlem podobným vzorku (úprava prostředí pro vlastní vzorek) [57;62].

*Dávkování vzorku* – dochází ke specifickým reakcím analytu s sorbentem. Analyt se selektivně sorbuje a matrice (nesorbované látky) prochází volně kolonkou [57;62].

*Promývání vzorku* – propláchnutí kolonky vhodným rozpouštědlem vede k vymytí zbytků matrice vzorku z kolonky. Analyt zůstává sorbován na pevné fázi [57;62].

*Sušení* – pokud se eluční rozpouštědlo výrazně liší od promývacího roztoku, kolonku je třeba vysušit proudem inertního plynu, nejčastěji dusíku [57;62].

*Eluce* - kolonka se promývá elučním rozpouštědlem, dochází k selektivní desorpci analytu z pevné fáze a k jeho vymytí z kolonky. Eluát se jímá a dále upravuje, např. pro chromatografickou analýzu [57;62]. Při extrakci penicilinových antibiotik může být jako eluční činidlo použit methanol [43;60] nebo 5% roztok ethylaminu v methanolu [47].



**Obrázek č. 18:** Postup extrakce tuhou fází [58].

#### 2.4.2.2. Lyofilizace

Při stanovení penicilinových antibiotik může být vzorek zakoncentrován také lyofilizací [50;59].

Lyofilizace je sušení vymrazováním. Návratnost lyofilizace je více než 80 %, což je o něco více než při SPE extrakci [59].

Před lyofilizací jsou obvykle vzorky odpadní vody přefiltrovány přes křemenný filtr (0,1 µm) a pH filtrátu je upraveno na 7,5. Ke vzorku je přidána sodná sůl ethylendiamintetraacetátu (EDTA). EDTA vytvoří komplex s vápenatými a hořečnatými ionty. Zabrání se tak tvorbě pevných uhličitanů těchto iontů. Vzorek je rotačně zmražen v ethanolové lázni při teplotě -30°C a následně sušen ve vakuu. Fáze sušení trvá asi 15 hodin. Poté je vzorek rozpuštěn ve fosfátovém pufru [50;59].

### 2.4.3. Vlastní separační metoda

Vlastní separace antibiotik se nejčastěji provádí kapalinovou chromatografií (HPLC) a plynovou chromatografií (GC) [45]. Při použití plynové chromatografie je však většinou nutná derivatizace [59;60]. V poslední době se začíná používat i separace kapilární elektroforézou (CE), která je alternativou k HPLC [60].

### 2.4.4. Kapalinová chromatografie

Kolonová kapalinová chromatografie (*liquid column chromatography, LC*) je metoda již dlouho známá. V klasickém provedení (kolony délky až 0,5 m, vnitřní průměr kolem 10 mm, průměr částic stacionární fáze 0,05 až 1 mm) se používala až do poloviny šedesátých let. Mobilní fáze se pohybovala gravitací, průtok činil řádově jednotky mililitrů za minutu. Separace byly málo účinné (desítky teoretických pater) a doba analýzy dlouhá (až několik hodin). Klasická kapalinová chromatografie se stále používá pro separace jednoduchých směsí, např. k oddělení rušících složek před spektrofotchemickým nebo elektrochemickým stanovením. Pro separaci komplikovaných směsí látek je ale tato metoda prakticky nepoužitelná. K těmto účelům v současné době slouží vysokoúčinná kapalinová chromatografie (*high performance liquid chromatography, HPLC*) [61].

Moderní analytická vysokoúčinná kapalinová chromatografie se od klasické kolonové kapalinové chromatografie odlišuje především tím, že pracuje s kratšími kolonami (3 – 30 cm) a menším vnitřním průměrem (0,5 – 4 mm) a s vysokou účinností (více než 40 000 teoretických pater). Vysoké účinnosti se dosahuje použitím náplní s malými částicemi (střední průměr 1 – 10  $\mu\text{m}$ ) s úzkou distribucí velikostí. S těmito kolonami se musí pracovat při vyšších tlacích (až do 40 MPa), aby bylo možno dosáhnout přijatelného průtoku a doby analýzy [63].

Separace složek vzorku je založena na opakovaném velmi rychlém ustavování rovnovážné distribuce jednotlivých látek mezi náplní kolony (stacionární fází) a okolním kapalným médiem (mobilní fází), které protéká kolonou a unáší s sebou složky vzorku. Rozdíly v distribuci jednotlivých složek mezi oběma fázemi vedou k tomu, že složky migrují kolonou s různými rychlostmi a vystupují z kolony v různém čase. To se na časové závislosti odezvy detektoru (chromatogramu) projeví vzájemně oddělenými elučními vlnami (píky) [63].

Mobilní fáze je v HPLC kapalná a stacionární fáze jsou zpravidla tuhé organické polymerní sorbenty či anorganické oxidy, nejčastěji s chemicky modifikovaným povrchem. Kapalnou stacionární fázi se v současné praxi téměř nepoužívají. Kombinaci použité stacionární a mobilní fáze označujeme jako chromatografický systém. Charakter a složení stacionární a mobilní fáze v HPLC určují termodynamický aspekt separačního procesu, tj. interakce mezi složkami vzorku a mobilní i stacionární fází. Podle interakcí, které v chromatografických systémech převažují, můžeme rozlišit čtyři základní typy chromatografických systémů [63]:

- Rozdělovací chromatografie - Chromatografie v systémech s normálními fázemi
- Chromatografie v systémech s obrácenými fázemi

Adsorpční chromatografie

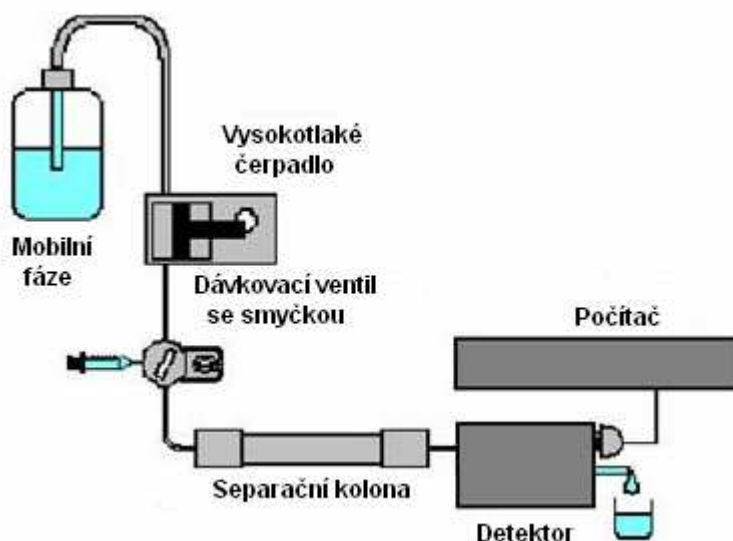
Chromatografie iontové výměny

Gelová chromatografie

Základní vlastností, určující chromatografické chování, je polarita složek vzorku a fází. Pokud je polarita stacionární fáze větší než polarita fáze mobilní, jedná se o systém s normálními fázemi. Systémy, kde je mobilní fáze polárnější než fáze stacionární, se označují jako systémy s obrácenými fázemi [63].

#### 2.4.4.1. Kapalinový chromatograf

Kapalinový chromatograf [Obr. 19] je tvořen zásobníky mobilní fáze, směšovacím zařízením, čerpadlem, dávkovacím zařízením, kolonou a detektorem. Novější typy kapalinových chromatografů obsahují také degaser. Pokud kapalinový chromatograf degaser neobsahuje, musí být mobilní fáze odplyněna v ultrazvuku.



**Obrázek č. 19:** Schéma HPLC [89].

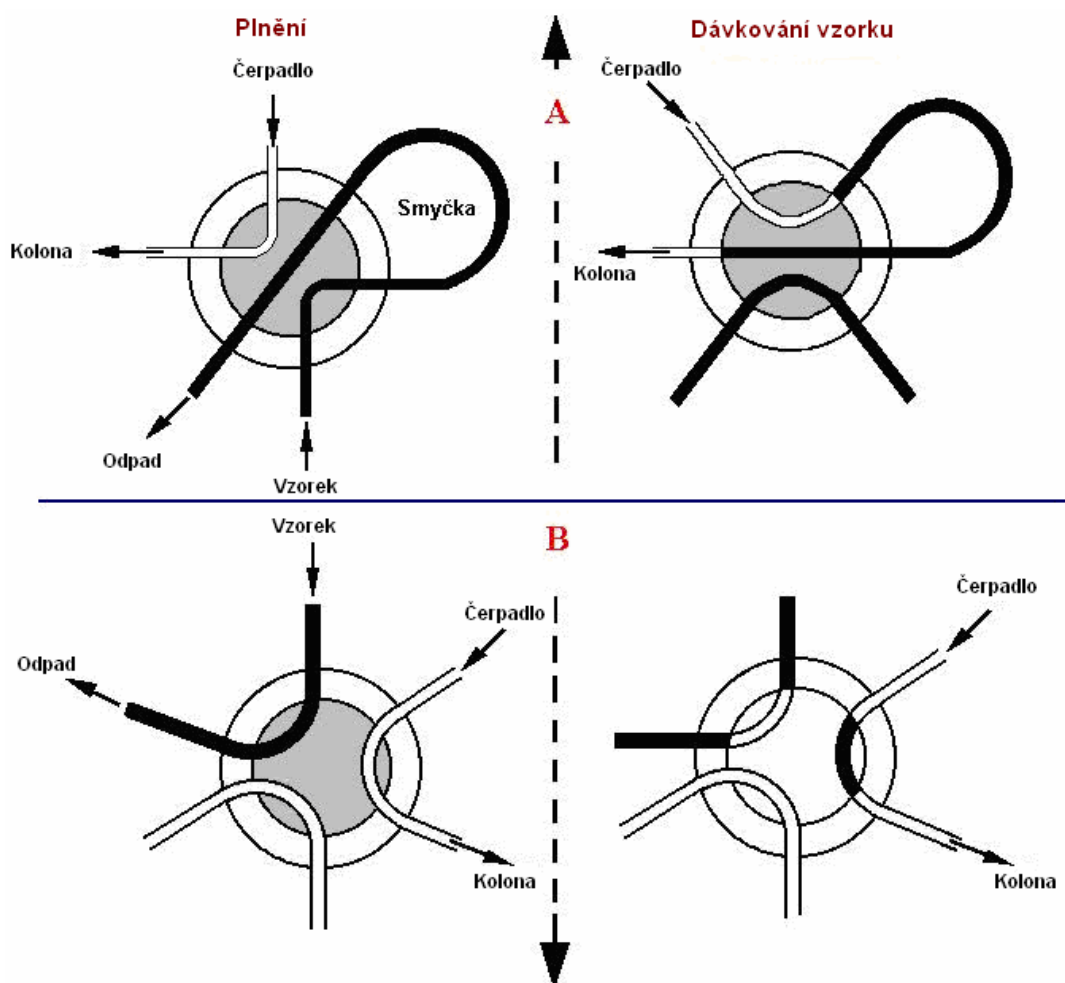
Kapalinový chromatograf může obsahovat zásobníky více kapalin. Systémy ovládané mikroprocesory jsou schopny přesně přivádět mobilní fázi buď s konstantním složením (izokratická eluce), nebo se složením, které se mění podle předem daného programu (gradientová eluce) [65].

Mobilní fáze se do kolony čerpá pístovými nebo membránovými čerpadly. Pístové čerpadlo je válec, do něhož je definovanou rychlostí zasouván píst. Rychlost pístu je přímo úměrná průtoku mobilní fáze. Membránové čerpadlo se liší tím, že má prostor s pístem naplněný hydraulickou pracovní kapalinou. Ten je oddělen od pracovního prostoru pro mobilní fázi membránou. Obvykle pracují dvě čerpadla tak, aby na sebe navazovaly fáze výtlaku a fáze sání [62;64].

Roztok vzorku se dávkuje do protékající mobilní fáze na horní konec kolony nebo blízko něho. Dávkování injekční stříkačkou přes pryžové septum (těsnění) proti vysokému tlaku je možné z hlediska těsnosti do tlaků 10 MPa [62]. Ruční dávkování však může způsobit horší přesnost nastříkaného objemu. Výhodnější je dávkování obtokovým dávkovacím kohoutem [62;65]. Dávkovací vysokotlaké obtokové ventily umožňují dávkovat i při tlaku 60 až 80 MPa. Dávkovacím ventilem může být dávkován konstantní objem vnitřního prostoru ventilu [Obr. 20 - B] nebo může být použita dávkovací smyčka [Obr. 20 - A]. Automatické dávkovače spojené se zásobníkem vzorků, ve kterém jsou umístěny vialky uzavřené pryžovým septem, se nazývají autosamplery. Technické principy vlastního dávkování vzorku



jsou různé. Buď je vzorek dávkován pomocí vícecestných (většinou šesticestných) ventilů nebo pomocí několika třicestných ventilů [62;65;70].



**Obrázek č. 20:** Dávkovací ventily [70].

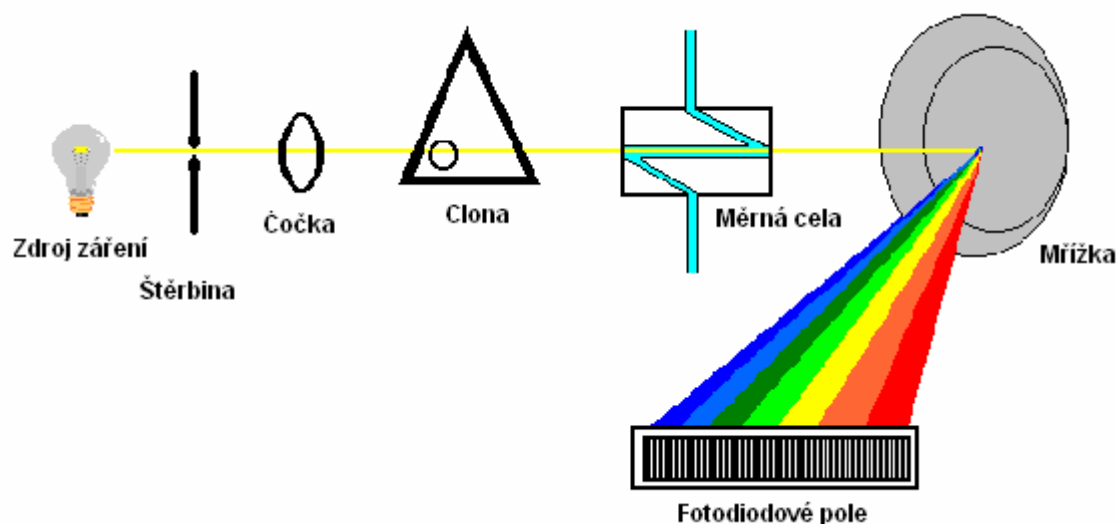
Dávkované vzorky jsou vedeny do kolony. Kolony jsou obvykle vyrobeny z nerezové oceli, avšak mohou být i skleněné nebo plastové. Jejich vnitřní průměr se pohybuje řádově od 0,5 do 4 mm [63]. Z kolony je eluát veden do detektoru. Signál detektoru se vyhodnocuje počítačem [61].

#### 3.4.4.2. Detektory v HPLC

Na detektory pro HPLC jsou kladeny mimořádné požadavky jako je vysoká citlivost (detekce látek v roztoku v koncentracích ng až  $\mu\text{g/ml}$ ), reprodukovatelnost a linearita odezvy, nezávislost odezvy na změně složení mobilní fáze při gradientové eluci a také univerzálnost (detekce všech oddělených složek vzorku) [66].

Nejčastěji se v současné praxi HPLC používají *spektrofotometrické detektory* pracující v ultrafialové a viditelné oblasti elektromagnetického záření. Spektrofotometrický detektor měří absorbanci eluátu vycházejícího z kolony, a proto musí detekovaná látka absorbovat záření použité vlnové délky a současně musí toto záření co nejméně absorbovat mobilní fáze. Detektor může mít pevnou vlnovou délku (nejčastěji 254 nm), u složitějších je možné nastavení vlnové délky pomocí monochromátoru a nejdokonalejší může proměřit absorpční

spektrum v určené oblasti vlnových délek pomocí diodového pole (*Diode Array Detector - DAD*) [Obr. 21]. Nejčastěji se používají dvouaparskové spektrofotometry s průtokovou detekční celou. Cela musí být dostatečně malá při dostatečně dlouhé optické dráze (pro zachování potřebné citlivosti detekce). Detektor s diodovým polem opakovaně zaznamenává celá spektra během průchodu látky kyvetou. Získají se tak trojrozměrné chromatogramy (retenční čas, absorbance, vlnová délka). Tyto detektory mají význam především při určení homogenity píku. Spektrofotometrické detektory jsou poměrně jednoduché, provozně spolehlivé, lze jimi detekovat velký počet látek a jsou kompatibilní s gradientovou elucí [61;63;64;72].



**Obrázek č. 21:** Schéma spektrofotometrického detektoru diodového pole [70].

Jedním z nejcitlivějších detektorů používaných v kapalinové chromatografii je *fluorimetrický detektor*. Používá se k detekci látek vykazujících přirozenou fluorescenci nebo látek, které lze na fluoreskující deriváty převést. Detekovaná látka v cele detektoru absorbuje budící záření z ultrafialové oblasti, jehož část pak vyzáří ve formě fluorescenčního záření o vyšší vlnové délce. Toto záření se zpravidla měří pod úhlem  $90^\circ$  k záření budícímu. Zdrojem budícího záření může být rtuťová výbojka, deuteriová, wolframová nebo xenonová lampa nebo laser. Tento detektor je využíván tehdy, je-li vyžadována současně vysoká selektivita a citlivost měření, tj. při stopových analýzách látek v komplikovaných matricích, např. při sledování metabolitů léčiv, při analýze aminokyselin, složek nukleových kyselin atd. [61;63;64].

Další skupinou selektivních a citlivých detektorů jsou *detektory elektrochemické*. Tyto detektory měří proud, vyvolaný při průchodu redukovatelné nebo oxidovatelné látky měrnou celou s elektrodami. Na elektrody je vloženo napětí potřebné k průběhu elektrochemické reakce. *Amperometrické detektory* používají většinou tři elektrod – měrné, na níž probíhá elektrochemická reakce, srovnávací a pomocné. Tyto detektory se vyznačují vysokou selektivitou a citlivostí. Jsou ale velmi citlivé na čistotu mobilních fází, z nichž musí být odstraněn rozpuštěný kyslík a které musí být vodivé. Proto se do nich přidává pufr nebo jiný vhodný elektrolyt, který nesmí rušivě ovlivňovat chromatografický separační proces. Amperometrické detektory nejsou proto vhodné pro použití při gradientové eluci. Ještě citlivější jsou *coulometrické detektory*, které pracují s průtočnými elektrodami, na nichž, na rozdíl od amperometrických detektorů, dochází k úplnému průběhu elektrochemické reakce analyzovaných látek. U těchto detektorů lze řadit dvě nebo více cel za sebou. Na každé cele při jiném vložení elektrodového potenciálu mohou probíhat jiné elektrochemické reakce, čímž se zvýší selektivita, případně i citlivost detekce [63].

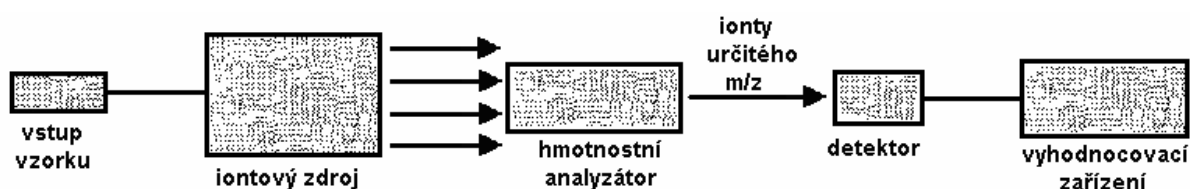
*Vodivostní detektory* měří elektrickou vodivost eluátu z kolony v průtokové cele se dvěma vzájemně izolovanými kovovými elektrodami. Pracují s vloženým střídavým napětím, aby se zabránilo polarizaci elektrod. Používají se téměř výhradně pro detekci iontů při tzv. iontové chromatografii. Protože separace iontových látek vždy vyžaduje přidavek elektrolytu k mobilní fázi, která je vodivá, jsou detektory konstruovány tak, aby umožňovaly citlivě registrovat i nepatrné změny relativně vysokých hodnot vodivosti. Případně se vodivé ionty složek mobilní fáze před vlastní detekcí odstraňují na tzv. potlačovacích (supresorových) kolonách [63].

Z univerzálních detektorů pro HPLC je nejstarší *detektor refraktometrický*, který při průchodu látky měrnou kyvetou poskytuje odezvu úměrnou rozdílu indexu lomu mezi měrnou kyvetou a kyvetou srovnávací (naplněnou čistou mobilní fází). Tento detektor sice umožňuje detekci v podstatě všech látek, je však mnohem méně citlivý než detektory spektrofotometrické. Jeho odezva silně závisí na teplotě, na rychlosti průtoku a na složení mobilní fáze, takže jej nelze použít při gradientové eluci. V současnosti se již používá méně často [63].

Univerzálním detektorem, který lze použít při gradientové eluci, je *detektor rozptylu světla* na tuhých částicích rozptýlených v proudu plynu, po předchozím odpaření mobilní fáze (evaporative light-scattering detector – ELSD). Tento detektor má lepší citlivost než refraktometrický detektor. K jeho úspěšné funkci je však třeba, aby všechny složky mobilní fáze měly dostatečně větší těkavost než separované látky. Pro každou aplikaci je třeba optimalizovat teplotu odpařování mobilní fáze a průtok plynu [63].

#### 2.4.4.3. HPLC-MS

Rámec pouhé detekce přesahuje kombinace HPLC s *hmotnostní spektrometrií*. HPLC-MS techniky spojují výhody univerzální a vysoce selektivní detekce s možností identifikace složek vzorku. Spojení HPLC-MS umožňuje získat informace o molekulových hmotnostech, případně i o struktuře látek separovaných kapalinovou chromatografií [67].



**Obrázek č. 22:** Obvyklé schéma hmotnostního spektrometru [72].

Technické potíže při přímém spojení HPLC-MS jsou však podstatně větší než u spojení GC-MS, protože nosné médium (mobilní fáze) je kapalina. Do iontového zdroje hmotnostního spektrometru proto vstupuje řádově větší počet molekul, než při zavádění plynné fáze a přechod k vysokému vakuu nezbytnému pro funkci hmotnostního spektrometru je obtížnější. Rozdíl tlaků mezi kapalinovým chromatografem a hmotnostním spektrometrem je osm až deset řádů [67].

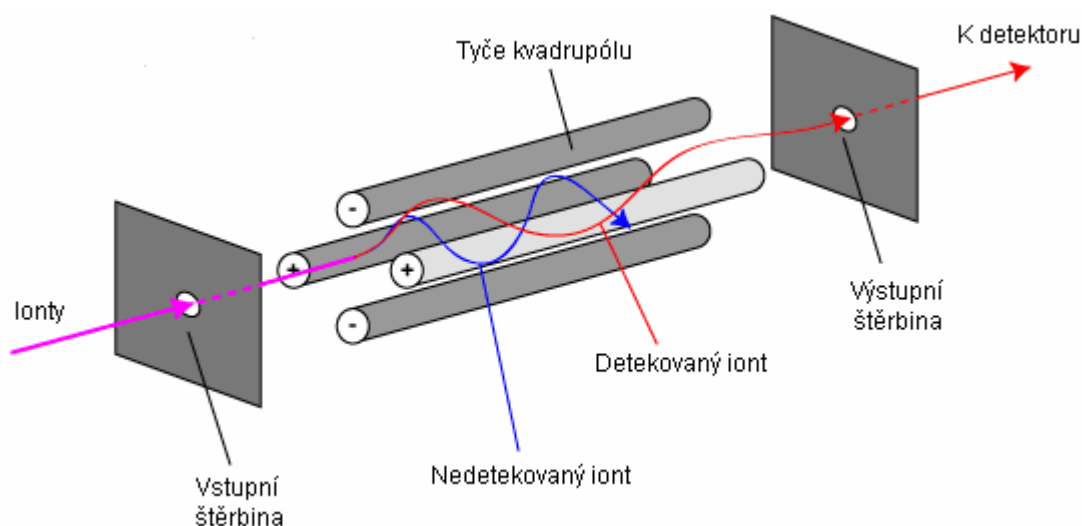
Postupně byla navržena různá technická řešení, s cílem zajistit co nejúčinnější převod vzorku do hmotnostního spektrometru při potlačení rušivého vlivu velkého nadbytku mobilní fáze. V současné době se uplatňuje především ionizace elektrosprejem (ESI) nebo chemická ionizace při atmosférickém tlaku (APCI) [63;67].

Při ionizaci elektrosprejem se roztok vzorku kontinuálně přivádí do iontového zdroje kapilárou o vnitřním průměru 100  $\mu\text{m}$ . Na ústí kapiláry je vloženo napětí 3-5 kV, které

vytváří silné elektrostatické pole. Po rozprášení mobilní fáze na výstupu z kapiláry vznikají malé kapičky s velkým nábojem. Kapičky z kapiláry vstupují velkou rychlostí do vyhřívaného prostoru proplachovaného protiproudem sušícího plynu, kde dochází k rychlému odpaření mobilní fáze z povrchu kapiček. Kapičky nesou na svém povrchu náboj, jehož hustota se zvyšuje s odpařováním mobilní fáze z povrchu kapiček. Po překročení kritické hodnoty povrchového náboje dojde k rozpadu na ještě menší kapičky. Tento proces se opakuje, až dojde k uvolnění iontů. Spojení HPLC-MS s ionizací elektrosprejem je vhodné pro silně polární nebo iontové látky, zejména však pro biopolymery (peptidy, proteiny), které za podmínek ionizace tvoří vícenásobně nabitě ionty, což umožňuje analyzovat i látky s molekulovými hmotnostmi až do cca 150 000 [63;67].

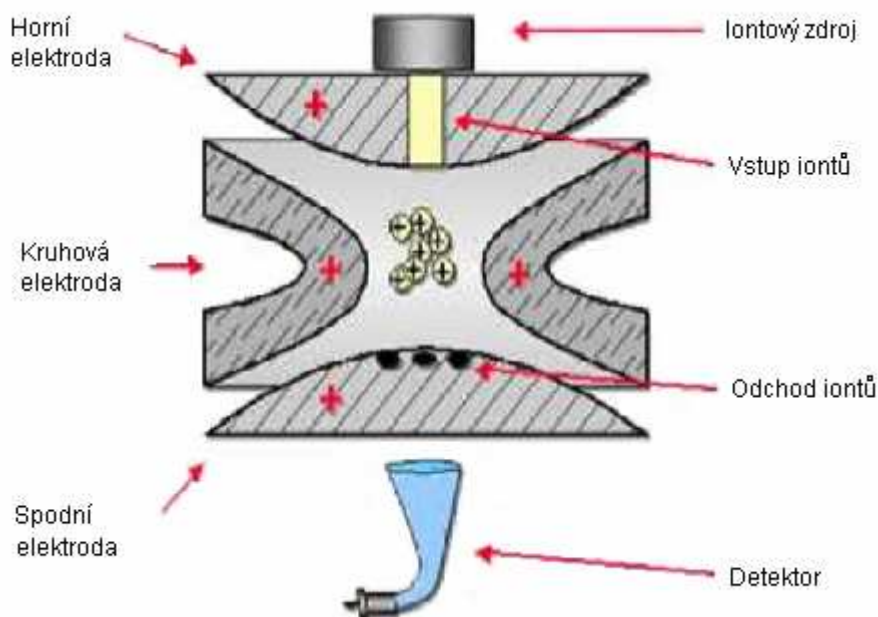
Chemická ionizace při atmosférickém tlaku využívá podobného uspořádání iontového zdroje jako při ionizaci elektrosprejem. Do iontového zdroje se kapalina kontinuálně přivádí kapilárou, na jejímž ústí se bleskově odpaří ve vyhřívané zóně při 300 – 650°C. Hlavním rozdílem proti elektrospreji je to, že na ústí kapiláry není vloženo elektrické napětí, ale zdroj je vybaven jehlovou elektrodou s vloženým vysokým napětím (cca 3 000 V), která pomocí koronárního výboje ionizuje molekuly rozpouštědla. Ionty rozpouštědla v plynné fázi slouží jako reakční plyn pro ionizaci analytu, podobně jako u klasické chemické ionizace. Chemickou ionizaci při atmosférickém tlaku lze použít pro kapalinovou chromatografii slabě až silně polárních látek v systémech s obrácenými i normálními fázemi [63].

Po ionizaci jsou ionty systémem fokusačních a urychlujících elektrod vtahovány do analyzátoru. Často je používán kvadrupólový analyzátor [Obr. 23] a jeho modifikace iontová past. Tyto analyzátory využívají kombinace stejnosměrného a radiofrekvenčního elektrického pole, která vytváří hmotnostní filtr pro ionty vstupující do tohoto kombinovaného pole. Hmotnostní filtr je tvořen čtyřmi paralelními kovovými tyčemi, které jsou umístěny v rozích čtverce. Tyče v diagonále jsou navzájem spojeny a připojeny ke zdrojům stejnosměrného a radiofrekvenčního napětí, jehož polarita se periodicky mění. Pro danou amplitudu napětí procházejí na detektor pouze ionty daného poměru  $m/z$ . Ostatní se pohybují po nestabilních drahách a narážejí na tyče, kde jsou vybity [67].



**Obrázek č. 23:** Schéma kvadrupólu [68].

Další variantou analyzátoru je monopól stočený do prstence - iontová past [Obr. 24]. Režim práce je inverzní ke kvadrupólovému přístroji. Je nastaven stabilní režim a ionty se postupně vypuzují k detektoru podle svých hodnot  $m/z$  nastavením nestabilních potenciálových podmínek v centru iontové pasti [67].

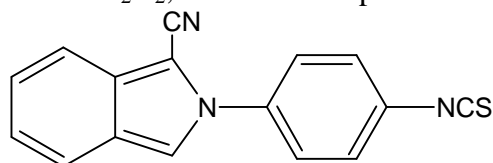


**Obrázek č. 24:** Schéma iontové pasti [69].

K vlastní detekci iontů může být použit např. elektronový násobič, který využívá sekundární emise elektronů. Proud iontů z hmotnostního separátoru je fokusován na první, konverzní dynodu, která emituje elektrony v množství přímo úměrném počtu dopadajících iontů. Sekundární elektrony z konverzní dynody jsou urychleny a fokusovány na druhou dynodu, kde po dopadu emitují další sekundární elektrony. Tento proces se opakuje na dalších 10 až 20 dynodách (kaskádový jev) [67].

#### 2.4.4.4. Separace antibiotik HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je velice hojně využívanou metodou pro stanovení antibiotik. Používá se často ve spojení s hmotnostním spektrometrem (HPLC-MS) [33;46;49;59] nebo tandemovým hmotnostním spektrometrem (HPLC-MS-MS) [43;47;50;52]. Toto spojení umožňuje univerzální a vysoce selektivní detekci s možností identifikace složek vzorku. Dalším využívaným systémem je spojení kapalinového chromatografu s detektorem diodového pole (HPLC-DAD) [48;51].  $\beta$ -laktámová antibiotika mohou být také stanovena pomocí kapalinového chromatografu ve spojení s fluorimetrickým (HPLC-FLD) nebo chemiluminiscenčním detektorem (HPLC-CLD). Tato detekce je však možná jen po předchozí derivatizaci. Derivatizaci je možné provést například reakcí s 4-(2'-kyanoisindolyl) fenylisothiokynatem (CIPIC) [Obr. 25]. CIPIC reaguje s primární amino skupinou  $\beta$ -laktámových antibiotik za vzniku derivátu, který je schopen fluorescence i chemiluminiscence (za přítomnosti  $H_2O_2$ , boritanového pufru a acetonitrilu) [71].



**Obrázek č. 25:** Struktura CIPIC [71].

Pro stanovení různých druhů antibiotik [ $\beta$ -laktámová antibiotika (peniciliny a cefalosporiny), sulfonamidy, tetracykliny] je často využívána kolona se silikagelem modifikovaným alkyly  $C_{18}$  [33;43;46;47;49;50;51]. Pro stanovení  $\beta$ -laktámových antibiotik je možné použít i kolonu se silikagelem modifikovaným CN skupinami [48]. Jako mobilní fáze byla při tomto stanovení použita kyselina šťavelová a acetonitril [48]. Při použití silikagelu modifikovaného  $C_{18}$  alkyly jako stacionární fáze pro stanovení  $\beta$ -laktámových antibiotik, může být jako mobilní fáze použita kyselina octová s acetonitrilem [50], kyselina mravenčí, methanol a acetonitril [43] nebo voda a acetonitril, oba s přísadkou kyseliny mravenčí [46;47].

#### **2.4.5. Plynová chromatografie**

Principem chromatografie je distribuce složek mezi dvě fáze, mobilní a stacionární. Plynová chromatografie (GC) nese své označení podle skupenství mobilní fáze, kterou je plyn. Podle použité stacionární fáze lze plynovou chromatografii rozdělit na [61;73]:

Plynová adsorpční chromatografie (GSC) – separace analytu probíhá na základě adsorpce složky z plynné fáze na povrch pevného sorbentu (např. silikagel, aktivní uhlí, aluminu) [73;74].

Plynová rozdělovací chromatografie (GLC) – separace analytu probíhá na základě distribuce složky mezi plynnou mobilní a kapalnou stacionární fází [74].

Toto rozdělení je do určité míry formální, podle převažujícího procesu, protože i v GLC byla pozorována adsorpce na nosiči nebo stěně kapilární kolony. Použití plynové adsorpční chromatografie je omezeno na separaci plynů a některých kapalin s nízkou molekulovou hmotností. Podstatně větší uplatnění má plynová rozdělovací chromatografie [74].

Pokud má být vzorek analyzován metodou plynové chromatografie, musí být všechny složky vzorku vypařeny definovaným způsobem. V praxi to znamená, že plynová chromatografie je vhodná především pro organické látky s teplotou varu asi do 400°C. Podmínkou je, aby se látky při vypařování nerozkládaly. Teplota 400°C představuje horní teplotní limit většiny běžných plynových chromatografů. Plynová chromatografie je vhodná i pro analýzu anorganických těkavých sloučenin. V některých případech lze analyzovat i látky netěkavé, pokud tyto látky převedeme na těkavější deriváty [74].

V plynové chromatografii se mobilní fáze označuje jako nosný plyn. Nosný plyn zajišťuje transport složek vzorku kolonou a přitom se sám neúčastní separačního procesu. Jako nosné plyny jsou používány vodík, dusík, helium nebo argon [74].

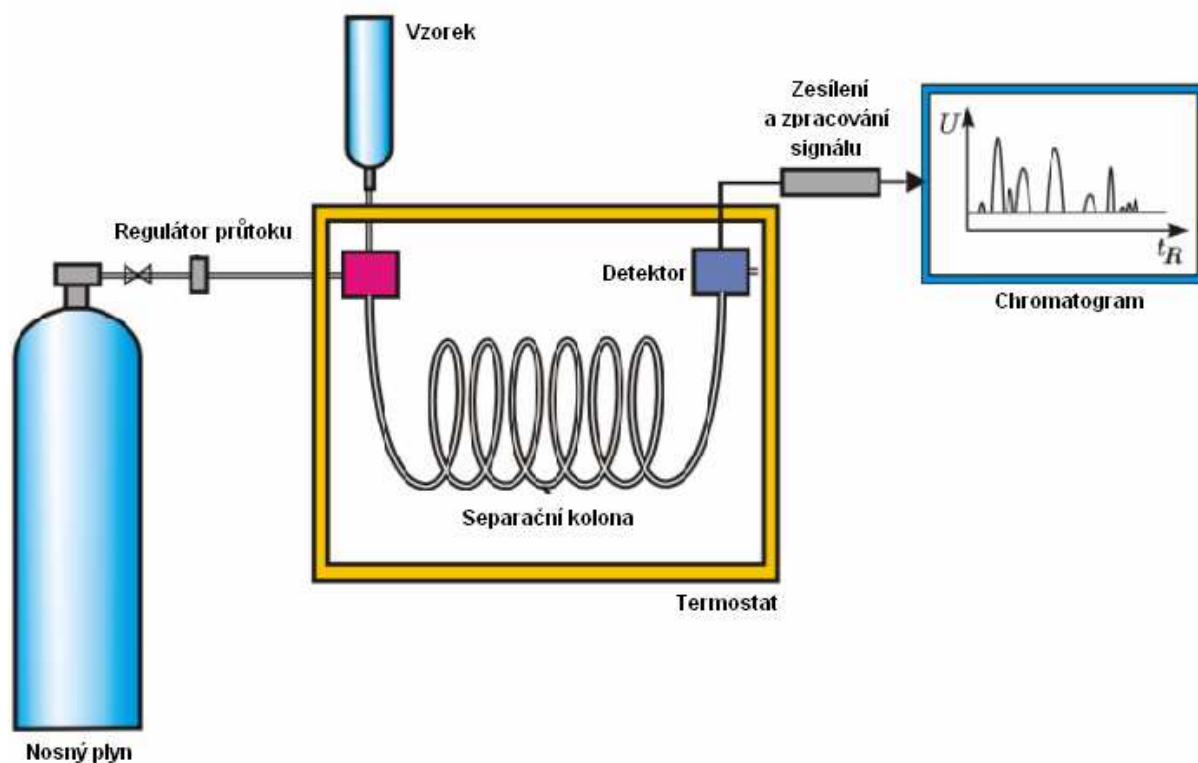
##### **2.4.5.1. Plynový chromatograf**

Plynový chromatograf [Obr. 26] je tvořen zdrojem nosného plynu, čistícím zařízením, regulačním systémem, dávkovacím zařízením, kolonou, termostatem a detektorem [72].

Zdrojem nosného plynu jsou běžné tlakové láhve opatřené redukčním ventilem. Jako nosný plyn může být použit vodík, helium, dusík nebo argon. Volba nosného plynu se řídí podle použitého detektoru [64].

Čistící zařízení zachycuje vlhkost a nečistoty v nosném plynu. Zbavuje nosný plyn nežádoucích stop ostatních plynů, zejména reaktivního kyslíku, který nevratně poškozuje stacionární fázi v koloně [72].





**Obrázek č. 26:** Plynový chromatograf [90].

Průtok nosného plynu je regulován mechanickými nebo elektronickými regulátory. Průtok nosného plynu může být stálý nebo se může měnit podle předem daného programu [64;72].

Dávkovací zařízení slouží k zavedení vzorku do proudu nosného plynu. Technika dávkování musí zajistit odpaření vzorku v co nejkratším čase. Roztoky dávkuje injekčními stříkačkami (0,1 - 10  $\mu$ l) přes pryžové septum. Pro plynné vzorky se používají plynotěsné injekční stříkačky nebo obtokové dávkovací kohouty různých konstrukcí. Existují různé metody nástřiku vzorku. U náplňových kolon je základní metodou nástřik do kolony (*on column*). Nástřik pomocí děliče toku (*split injection*) je využíván u kapilárních kolon, které mají malou kapacitu, proto se zejména u koncentrovaných vzorků musí pomocí děliče toku jeho část s nosným plynem oddělit. Do kolony se tak dostává jen definovaný zlomek nástřikovaného množství. Nástřik bez děliče toku (*splitless injection*) je vhodný pro relativně velké objemy, které je nutno použít pro stopovou analýzu. Vzorek se dávkuje pomalu do odpařovací trubice a nechá se asi 60 sekund odpařovat. Poté se provede oplach septa [72].

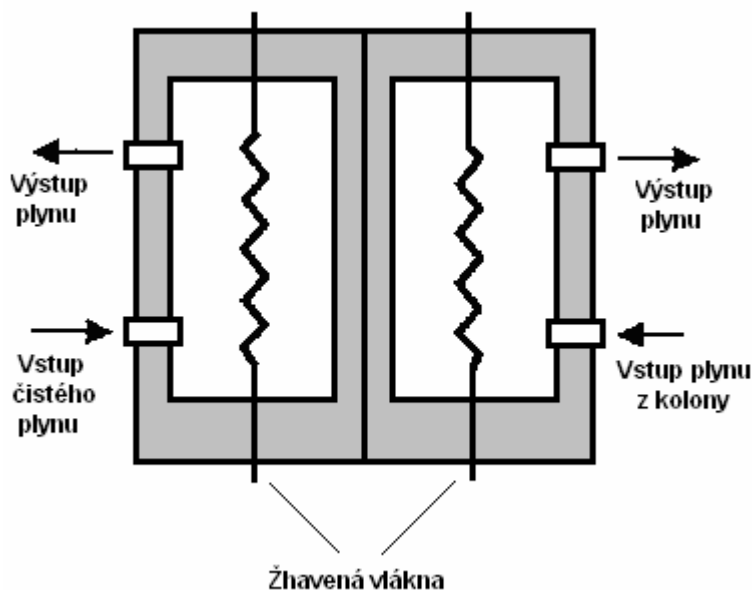
Separace složek nastává v koloně. V plynové chromatografii jsou používány dva základní typy kolon, náplňové a kapilární. Náplňové kolony jsou z nerezové oceli nebo skla o průměru 3 – 8 mm a délce 1 – 5 m. Náplň je kapalná stacionární fáze zakotvená na povrchu nosiče (nepolární a povrchově inaktivní křemičitany) nebo povrchově aktivní sorbent (aktivní uhlí, silikagel, alumina) [74]. Vzhledem k vyšší účinnosti se používají převážně kapilární kolony. Kapilární kolony jsou otevřené kapiláry, kde funkci nosiče zastávají vnitřní stěny kapiláry, které jsou pokryty kapalnou stacionární fází. Kapilární kolony se obvykle vyrábí z taveného křemene. Vnitřní průměr kolon je 0,1 – 0,6 mm, tloušťka filmu stacionární fáze 0,25 – 5  $\mu$ m, délka 15 – 60 m [66;72;74].

Termostat zajišťuje dostatečně vysokou teplotu dávkovače, kolony a detektoru, aby byl vzorek udržen v plynném stavu [72].

Nosný plyn vystupující z kolony protéká detektorem, který reaguje na přítomnost analytu a vysílá signál, který je zaznamenáván v závislosti na čase [72].

#### 2.4.5.2. Detektory v GC

Detektor sleduje takovou vlastnost plynu z kolony, která závisí na druhu a koncentraci složek. Detektor musí mít dostatečnou citlivost a jeho odezva by měla být lineární funkcí obsahu analytu. Důležitým požadavkem je také vysoká selektivita pro stanovované analyty. Mezi nejpoužívanější detektory patří tepelně vodivostní detektor, plamenový ionizační detektor a detektor elektronového záchytu [72].

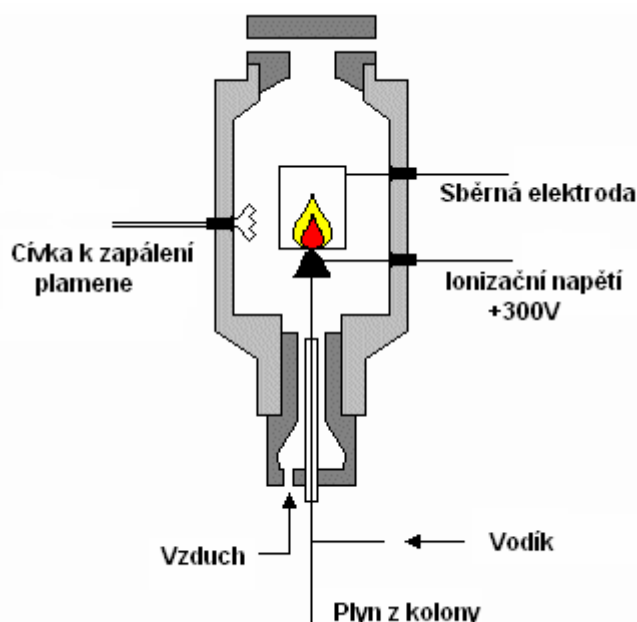


**Obrázek č. 27:** Tepelně vodivostní detektor [72].

Tepelně vodivostní detektor (*Thermal Conductivity Detector – TCD*) [Obr. 27] měří změny tepelné vodivosti mobilní fáze způsobené přítomností eluované látky. Detektor má dva paralelní kanálky, jeden referenční s konstantním průtokem nosného plynu a druhý měrný, který je připojen na výstup z kolony. V kanálcích jsou umístěna žhavená odporová vlákna. Vláknem prochází konstantní elektrický proud a zahřívá je na určitou teplotu. Jestliže detektorem prochází čistý nosný plyn o stálém průtoku, je teplota odporového vlákna konstantní. Obsahuje-li plyn eluovanou složku s jinou tepelnou vodivostí než má nosný plyn, změní se teplota vlákna a tím i jeho elektrický odpor. Tepelně vodivostní detektor je univerzální, má široký lineární dynamický rozsah, ale je málo citlivý [74;75].

Plamenový ionizační detektor (*Flame Ionization Detector – FID*) [Obr. 28] měří změny ionizačního proudu vodíko-vzduchového plamene způsobené přítomností eluované látky. Detektor je tvořen hořáčkem, na jehož spodní část je přiváděn nosný plyn a vodík. Ionty a elektrony, které se vytvoří spálením složek unášených nosným plynem, umožňují elektrický tok mezi elektrodami, na které je vloženo stejnosměrné napětí. Vzduch jako pomocný plyn se přivádí do spodní části detektoru. Jednotlivé konstrukce FID se od sebe liší zejména úpravou a geometrií elektrod. Tento typ detektoru není citlivý na neuhlovodíkové plyny ( $H_2$ ,  $N_2$ ,  $O_2$ ,  $Cl_2$ ),  $H_2O$ ,  $H_2S$ ,  $CS_2$ ,  $HCOOH$ ,  $NH_3$ ,  $SiCl_4$  a oxidy S, N, C.[74;75].





**Obrázek č. 28:** Plamenový ionizační detektor [91].

Detektor elektronového záchytu (*Electron Capture Detector – ECD*) je tvořen dvěma elektrodami: emitorem, kde se jako zdroj měkkého radioaktivního záření užívá izotop  $^{63}\text{Ni}$ , a kolektorem. Mezi těmito elektrodami je vloženo napětí ze zdroje. Nosný plyn ( $\text{N}_2$  nebo  $\text{Ar} + \text{CH}_4$ ) je radioaktivním zářením ionizován a mezi elektrodami prochází ionizační proud. Obsahuje-li nosný plyn molekuly s afinitou k elektronům, dojde k poklesu ionizačního proudu. Tento pokles je po zesílení zaznamenán. Detektor elektronového záchytu je zvlášť citlivý na některé molekuly, jako jsou alkyhalogenidy, konjugované karbonylové sloučeniny, nitrily, nitráty a organokovové sloučeniny. Je málo citlivý k uhlovodíkům, alkoholům a ketonům. Vysoká citlivost k halogenovaným sloučeninám činí tento detektor zvlášť vhodným pro analýzu pesticidů [74].

#### 2.4.5.3. GC-MS

Spojení plynového chromatografu s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) má nezastupitelný význam. Je nepostradatelné zejména tam, kde se provádí identifikace neznámých složek směsí. Při spojení GC-MS lze pro každou separovanou složku získat hmotnostní spektrum a identifikovat ji porovnáním jejího spektra s knihovnou spekter sloučenin uloženou v počítači [74].

Plynový chromatograf může být s hmotnostním spektrometrem spojen přímo nebo přes omezovač, případně separátor. Při přímém způsobu je konec kolony zaveden do stěny iontového zdroje a jednotlivé složky směsi jsou po odchodu z kolony okamžitě detekovány a analyzovány. Tento způsob, který představuje tzv. bezetrátový přenos, je možný především při použití kapilárních kolon, kdy množství látky vcházející do hmotnostního spektrometru je dostatečně malé a systém turbomolekulárních vývěv je schopen udržet dostatečně nízké tlaky pro analýzu. Při použití náplňových kolon, kdy je průtoková rychlost a množství vycházející látky daleko větší, je většinou nutné použít omezovač, který propustí jen určité množství a zajistí tak zachování vhodných tlakových podmínek pro měření. Při použití separátoru je navíc ze směsi odstraněna velká část nosného plynu. Eluát je tak obohacen o analyzovaný vzorek. V dnešní době je již dominantně používáno přímé spojení, druhý

způsob je spíše historickou záležitostí. Riziku kondenzace par vzorku na stěnách interface (tj. konce kolony) a ve vnitřním prostoru iontového zdroje je zamezeno díky možnosti nezávislého temperování kolony, interface a iontového zdroje [67].

Iontový zdroj slouží k ionizaci organických sloučenin. Při srážce molekuly a letícího elektronu vzniká kladně nabitý molekulový iont, který se může rozpadnout na kladně nabitě fragmentové ionty. Tento proces se nazývá ionizace nárazem elektronu (EI). Fragmentace, způsobená nárazem elektronů o vysoké energii, má zejména u některých druhů látek, obsahujících méně stabilní vazby, za následek potlačení tvorby molekulového iontu, který je důležitý pro zjištění molekulové hmotnosti analyzované látky [67].

Při chemické ionizaci (CI) je pro ionizaci cílových molekul použit prostředník (plyn nebo některé složky mobilní fáze v případě kapalinové chromatografie). Tento prostředník je v iontovém zdroji přednostně ionizován elektrony o vysoké energii. Ionty cílové molekuly vznikají následnými interakcemi s ionty prostředníka nebo s elektrony o nízké energii. Takto je fragmentace cílové molekuly, vyvolaná srážkami s primárními vysokoenergetickými elektrony, potlačena ve prospěch tvorby iontů o vyšší hmotnosti včetně molekulárního iontu [67].

Plynová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií (GC-MS-MS) je vysoce selektivní metoda. První hmotnostní analyzátor zabezpečuje po ionizaci separaci molekulových iontů, které odpovídají různým složkám analyzované směsi. Vybrané molekulové ionty z prvního analyzátoru se aktivují srážkami s excitovanými atomy inertního plynu (helium) při vyšším tlaku. Rozpadem těchto iontů vznikají fragmentové ionty. Ty jsou pak separovány pomocí druhého analyzátoru [76].

Spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií má velký význam v analýze léčiv, reziduí pesticidů, průmyslových kontaminantů, anabolických steroidů, alkaloidů a jiných analytů v různých typech biologických matric rostlinného i živočišného původu. Tato metoda je vhodná pro monitorování čistoty životního prostředí (vody, půdy, vzduchu) a stanovení organických analytů ve vzorcích tuhých i kapalných průmyslových, komunálních nebo zemědělských odpadů [76].

#### **2.4.5.4. Separace antibiotik GC**

Separace plynovou chromatografií je základem pro stanovení velkého množství různých druhů léčiv. Většina léčiv však musí být předem derivatizována. GC-MS nebo GC-MS-MS mohou být stanovena léčiva jako ibuprofen nebo kyselina salicylová, jejichž derivatizace se provádí přidávkem diazomethanu (methylace karboxylových skupin) a acetanhydridu nebo triethylaminu (acetylace hydroxyskupiny na benzenovém jádře) [59].

Separace plynovým chromatografem může být použita i pro stanovení některých druhů antibiotik, například pro stanovení sulfonamidů nebo aminoglykosidů [78;79]. Sulfonamidy mohou být stanoveny pomocí plynového chromatografu s atomovým emisním detektorem (GC-AED). Před stanovením je nutná derivatizace převedením na N<sup>1</sup>-methyl deriváty [79]. Aminoglykosidy mohou být stanoveny GC-MS, je zde však také nutná předchozí derivatizace. Derivatizace bývá prováděna ve dvou krocích zahrnujících trimethylsilylaci hydroxy-skupiny pomocí trimethylsilylimidazolu a acylaci amino-skupiny heptafluorobutyrylimidazolem [78].

## 2.4.6. Kapilární elektromigrační metody

Kapilární elektromigrační separační metody jsou moderní separační techniky založené na elektroforetické migraci iontů ve stejnosměrném elektrickém poli. Principem separace složek vzorku je rozdílná rychlost jejich migrace, protože nabité částice různých složek se v určitém prostředí liší svou elektroforetickou pohyblivostí. Elektroforetická pohyblivost nabitých částic je rychlost jejího pohybu v elektrickém poli o jednotkové intenzitě. Elektroforetická pohyblivost závisí na náboji a velikosti částice [61;72].

Kapilární elektromigrační metody vynikají především malou spotřebou vzorku a činidel potřebných pro separaci, velkou účinností separace, velkou rychlostí analýzy a krátkou dobou potřebnou na optimalizaci separačních podmínek. Menší reprodukovatelnost a trochu nižší citlivost naproti tomu patří k hlavním nevýhodám těchto separačních technik [61].

Do kapilárních elektromigračních separačních metod řadíme celkem šest základních technik, které se liší především médiem přítomným v separační kapiláře během separace a vlastním mechanismem separace. Jsou to tyto metody [61]:

Kapilární zónová elektroforéza (Capillary Zone Electrophoresis - CZE)

Kapilární gelová elektroforéza (Capillary Gel Electrophoresis - CGE)

Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography – MECC, MEKC)

Elektrochromatografie v naplněných kapilárách (Capillary Electrochromatography – CEC, EC)

Kapilární izoelektrická fokusace (Capillary Isoelectric Focusing – CIEF, IEF)

Kapilární izotachoforéza (Capillary Isotachopheresis – CITP, ITP)

Některé z těchto metod lze použít pouze pro separaci iontů (CZE, CGE, IEF a ITP), ostatní jsou vhodné pro neutrální molekuly i ionty (MEKC a CEC). Čtyři z těchto elektromigračních metod, konkrétně CZE, CGE, MECC a CEC, se velmi často označují v literatuře společným názvem kapilární elektroforéza (Capillary Electrophoresis - CE) [61].

### 2.4.6.1. Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je díky své jednoduchosti a univerzálnosti nejčastěji používanou technikou v rámci kapilárních elektromigračních metod. Kapilární zónová elektroforéza je vhodná pro separaci a stanovení iontů lišících se svou molekulovou hmotností, tvarem a nábojem [61;76].

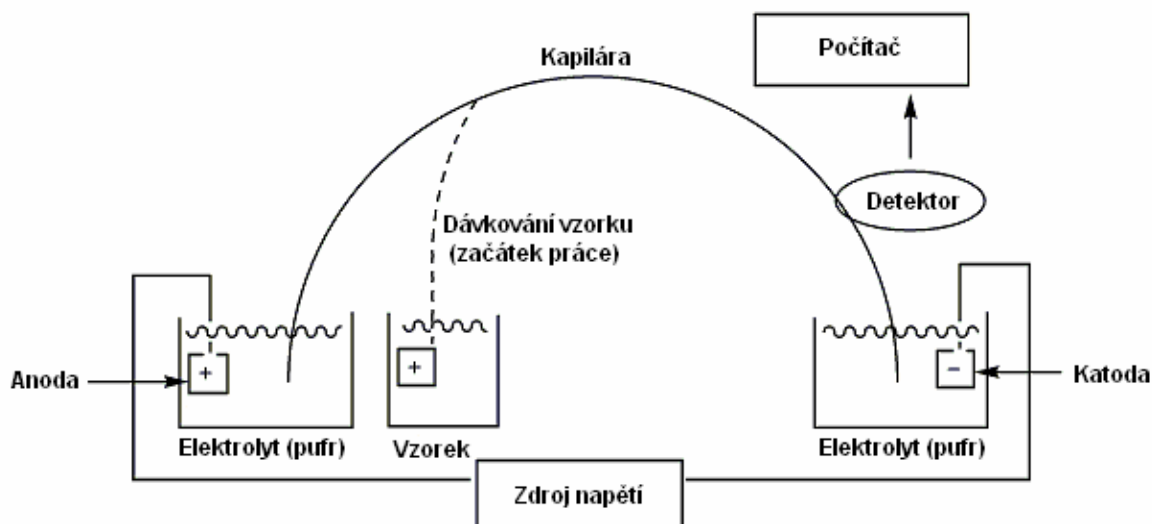
Kapilární zónová elektroforéza se provádí v tenké kapiláře. Malým vnitřním průměrem je zabráněno promísení separovaných částic difúzí. O směru pohybu kapaliny v kapiláře rozhoduje elektroosmotický tok (electroosmotic flow - EOF). Stěny kapiláry z taveného křemene obsahují silanolové skupiny, které se v kontaktu s pufrů o vyšším pH disociují. Tento povrch získává záporný náboj a pufr naopak kladný. Celkové vyměněné náboje jsou vzhledem k povrchu kapiláry velké. V elektrickém poli je vyvolán v kapiláře tok velkého množství kationtů pufru směrem k záporné elektrodě. Ten s sebou strhává veškerou kapalinu. Tok je tak silný, že nese ke katodě i anionty. Neutrální částice se pohybují stejnou rychlostí jako má elektroosmotický tok, nabité částice se pohybují buď rychleji (kationty) nebo pomaleji (anionty), v závislosti na své elektroforetické pohyblivosti. Během jednoho experimentu lze dělit, detekovat a stanovit oba dva druhy iontů, kationty i anionty. Metoda

CZE je použitelná pouze pro separace a stanovení molekul s nábojem a nehodí se pro neutrální molekuly [61;62;72].

Rozsah použití CZE je široký. Přestože typickým příkladem použití je separace anorganických iontů, má technika CZE využití i při separaci aminokyselin, biopolymerů, léčiv a mnoha dalších iontových sloučenin. CZE byla také úspěšně použita při stanovení léčiv a jejich metabolitů v biologických vzorcích. Společně s kapalinovou chromatografií má CZE velký potenciál při separaci polárních netěkavých environmentálních vzorků [76].

#### 2.4.6.2. Instrumentace CZE

Schéma kapilární elektroforézy je znázorněno na [Obr. 29]. Kapiláry jsou vyráběny z taveného křemene a mají ochranný polyimidový povlak. V místě detekce je malý podíl povlaku odstraněn. Kapilára je 25 až 100 cm dlouhá a nejčastěji používané vnitřní průměry jsou 50 a 75  $\mu\text{m}$ . Vnitřní povrch kapiláry může být chemicky modifikován kovalentním navázáním různých látek. Úprava povrchu je využívána pro různé účely, např. ke snížení adsorpce vzorku nebo ke změně iontového náboje na kapilární stěně [72].

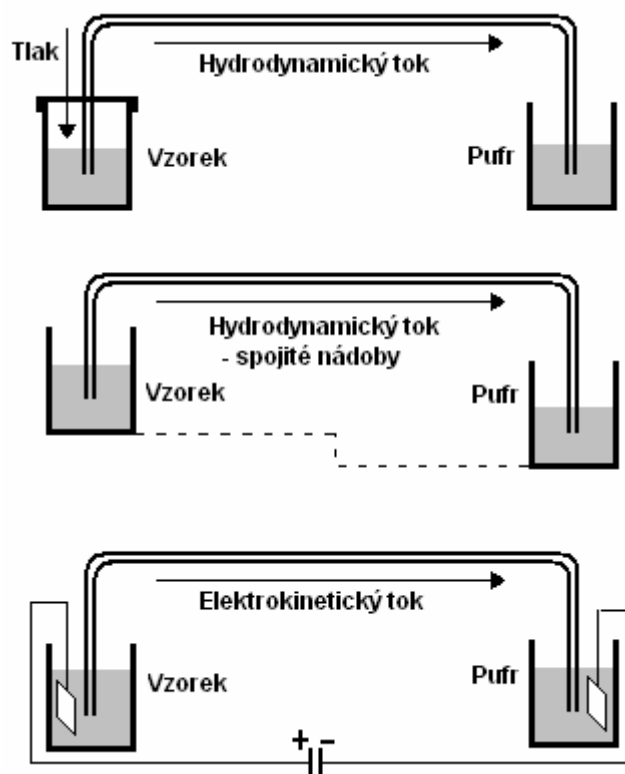


Obrázek č. 29: Schéma CZE [92]

Kapilára je naplněna základním elektrolytem, který vede proud. Její konce jsou ponořeny do zásobníků s elektrolytem, společně s elektrodami z inertního materiálu (Pt). Mezi elektrody se vkládá vysoké napětí (10 – 30 kV). Malý objem vzorku se dávákuje na začátku práce do konce kapiláry. Objem vzorku je řádově v nanolitrech, proto nelze použít dávkovacích smyček ani injekčních stříkaček používaných v chromatografii. Dávkování lze provádět několika způsoby [Obr. 30]. *Dávkování tlakem* patří k nejběžnějším. Konec kapiláry je ponořen do nádoby s roztokem vzorku a je aplikován zvýšený tlak na vzorek, tak dojde k nasátí vzorku do kapiláry. *Dávkování rozdílem hladin* je založeno na principu spojitých nádob. Méně je používáno *elektrokinetické dávkování*, kdy je konec kapiláry ponořen do nádoby s roztokem vzorku a je přivedeno napětí. Nevýhodou tohoto dávkování je nepoměr mezi původním složením vzorku a složením po dávkování, protože pohyblivější částice migruje do kapiláry více než méně pohyblivé [62;72].

Po nadávkování vzorku jsou oba konce kapiláry umístěny v elektrolytu a působením vysokého napětí dochází k separaci. Kapilára prochází přes detektor, obvykle

spektrofotometrický (viz kap. 3.3.4.2.). Možné je i spojení kapilární elektroforézy s hmotnostním spektrometrem (CE-MS) [62;72].

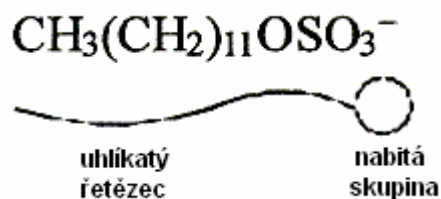


**Obrázek č. 30:** Dávkování vzorku v CZE [72].

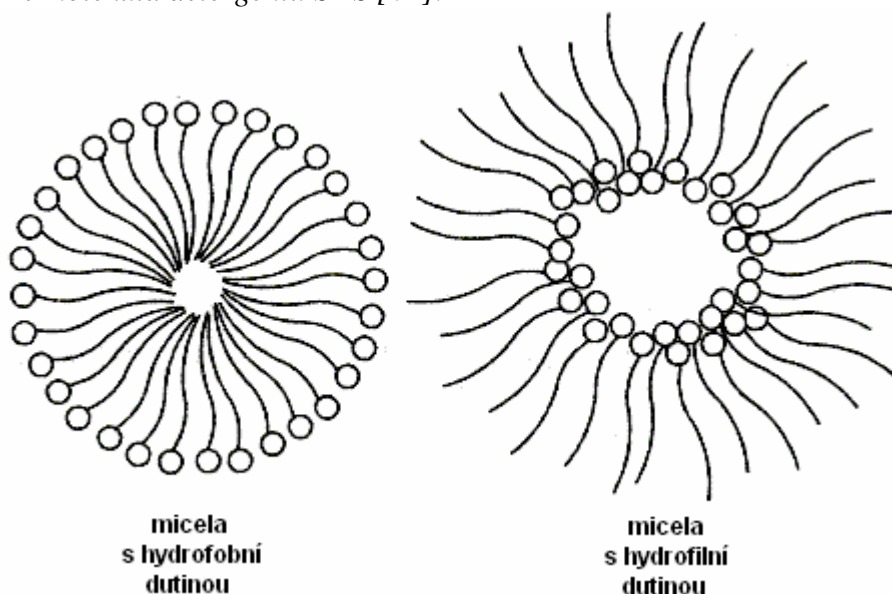
#### 2.4.6.3. Micelární elektrokinetická chromatografie

Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC), v literatuře někdy také označovaná jako micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC), umožňuje na rozdíl od CZE separaci neutrálních i nabitých látek. Je to elektromigrační metoda, která pro separaci nenabitých analytů využívá jejich solvatace v micelách, které vzniknou v separačním tlumivém roztoku po přidání vhodného tenzidu. Nejčastěji je používán aniontový tenzid dodecylsírán sodný (sodium dodecylsulfate - SDS) [Obr. 28]. Jeho molekula obsahuje dlouhý hydrofobní uhlíkatý řetězec zakončený hydrofilní disociovatelnou sulfátovou skupinou [Obr. 31]. Po přidání SDS do vhodného tlumivého roztoku (vodná fáze) se molekuly tenzidu začnou organizovat do prostorově kulovitých útvarů zvaných micely [Obr. 32] a vytvářejí tak micelární fázi. Micela vytvořená v hydrofilním prostředí vodného tlumivého roztoku má polární povrch, který je tvořený nabitými disociovanými síranovými skupinami a nepolární dutinou tvořenou k sobě seskupenými hydrofobními uhlíkatými řetězci. Pokud bychom naopak rozpustili SDS v nepolárním hydrofobním rozpouštědle (např. v hexanu), vznikly by obrácené micely, s hydrofilní dutinou a hydrofobním povrchem. Hydrofobní dutiny micel SDS, vytvořené ve vodném tlumivém roztoku, jsou schopny do sebe pojmout nepolární molekuly, které nejsou kompatibilní s vodným prostředím tlumivého roztoku a tím dochází k jejich rozpouštění v micelární fázi. Ve vodném separačním elektrolytu s micelami tenzidu budou neutrální molekuly analytů rozpuštěny tím více ve vodné fázi, čím jsou polárnější, a tím více v micelární fázi, čím jsou méně polární. Každý analyt bude v takovémto

tlumivém roztoku rozdělen podle polaritý své molekuly částečně mezi vodnou a částečně mezi micelární fází [61;77].



**Obrázek č. 31:** molekula detergentu SDS [61].



**Obrázek č. 32:** micely SDS [61].

Separační mechanismus v MEKC je založen na rozdílné distribuci neutrálních analytů mezi vodnou a micelární fází. Kulovité micely mají díky disociovaným síranovým skupinám molekul SDS záporný povrchový náboj. Díky svému zápornému náboji micely v elektrickém poli elektroforeticky migrují směrem k anodě. Neutrální analyty se podle své polaritý více či méně rozpouštějí v hydrofobních dutinách (kavitách) micel a ty je unášejí svojí elektroforetickou rychlostí uvnitř separačního elektrolytu směrem k anodě. Micelární fáze se v tomto ohledu chová podobně jako stacionární fáze v HPLC s tím rozdílem, že se pohybuje vlastní elektroforetickou rychlostí. Proto se velmi často označuje jako pseudostacionární fáze. Všechny micely migrují stejnou rychlostí, ale stupeň solvatace molekul micelami je rozdílný a udává rychlost transportu těchto molekul micelami. Čím více jsou molekuly analytu solvatovány pseudostacionární fází, tím rychleji jsou transportovány touto fází uvnitř separačního tlumivého roztoku směrem k anodě. Separační elektrolyt jako celek (s rozpuštěnými micelami i všemi analyty) je v kapiláře unášen elektroosmotickým tokem ke katodě a detektoru. Rychlost elektroosmotického toku je větší než elektroforetická rychlost micel. To zaručuje, že všechny neutrální analyty jsou ve výsledku transportovány směrem ke katodě (tj. k detektoru) i přesto, že pseudostacionární fáze je unáší uvnitř tlumivého roztoku směrem k anodě (tj. od detektoru). Látky více zadržované micelami mají delší retenční časy a naopak. Extrémně hydrofobní sloučeniny mohou být zcela solvatovány a zadrženy micelami a mohou být detekovány při  $t_{mc}$  (retenční čas micel). Takovou látkou

je např. *Sudan III* (velmi nepolární azobarvivo), který je používán ke značkování retenčního času micel. [61;72].

Micelární elektrokinetickou chromatografií mohou být separovány i analyty, které mohou částečně disociovat či protonizovat. Díky disociaci a protonizaci nesou tyto molekuly kladný nebo záporný náboj. Na jejich separaci se proto bude, kromě již zmíněné distribuce mezi vodnou a pseudostacionární fází, podílet i jejich rozdílná elektroforetická pohyblivost [61].

MEKC je technika blízká chromatografii na obrácených fázích. Avšak rozdělování složek je v MEKC a HPLC rozdílné, což dává odlišnou posloupnost píků. Dalším rysem MEKC je to, že všechny složky dávkované do kapiláry, jsou-li všechny rozpustné v elektrolytu, migrují mezi  $t_0$  a  $t_{mc}$ . To je rozdílné od HPLC, kde některé složky mohou být nevratně vázány na stacionární fázi. Technika MEKC se používá při separaci aminokyselin, nukleotidů, vitamínů a velké části farmak. Předností MEKC jsou velmi nízké hmotnostní detekční limity a vysoké rozlišení [72;76].

#### **2.4.6.4. Separace antibiotik CE**

Kapilární elektroforéza se díky širokým možnostem použití velmi rychle prosazuje v analytické praxi a je používána jako alternativa k HPLC [80;81]. Kapilární elektroforézou může být provedeno stanovení různých druhů léčiv a jejich reziduí, například spojením CE-MS mohou být stanoveny ibuprofen, naproxen a diklofenak (analgetika) [60].

Kapilární elektroforéza je společný název pro několik elektromigračních metod (CZE, MEKC, CGE a CEC). Pro stanovení antibiotik je často používána kapilární zónová elektroforéza a micelární elektrokinetická chromatografie. Kapilární zónovou elektroforézou mohou být stanoveny různé druhy antibiotik, jako cefalosporiny [82;83], makrolidy [84] a tetracykliny [85].  $\beta$ -laktámová antibiotika (benzylpenicilin [86;88], fenoxymethylpenicilin [87]) mohou být stanovena micelární elektrokinetickou chromatografií. Při těchto stanoveních se jako tenzid vytvářející micely používá dodecylsírán sodný. Ke detekci analytů lze použít detektor diodového pole.

### **3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

#### **3.1. Přístroje, zařízení, software**

##### **3.1.1. Příprava a extrakce vzorků**

- Analytické váhy HR-120, A&D Instruments, Japonsko
- pH metr InoLab WTW series, Nameko, ČR
- Ultrazvuková vodní lázeň, typ Teson 4, Tesla, ČR
- SPE extraktor Alltech, model 400-1902, s vakuovou pumpou, Barnant, Co., USA
- SPE Kolonky: Strata C18, Phenomenex, USA – 500mg/6ml  
BAKERBOND C18, USA – 500mg/3ml
- Filtry: Cronus syringe filters, PTFE, 13 mm, 0,45 m  
Cronus syringe filter nylon, 13 mm, 0,45 m  
Filtr ze skleněných mikrovláken, typ Z-4, 55 mm, Papírna Pernštejn s.r.o.
- Běžné laboratorní vybavení

##### **3.1.2. Kapalinová chromatografie**

- Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series, Agilent, USA
- Vakuová odplynovací jednotka HP 1100, příkon 30 VA
- Detektor diodového pole (DAD) – zdroj světla deuteriová (UV) a wolframová (VIS a blízké IČ) lampa, 1024 fotodiod, vlnový rozsah 190 – 950 nm, programovatelná šířka štěrbin 1 – 16 mm
- Kolona ZORBAX Eclipse XDB – C18, velikost 4,6 × 150 mm, velikost částic 5 µm

#### **3.2. Používané chemikálie a standardy**

##### **3.2.1. Chemikálie**

- Kyselina mravenčí, p.a., Riedel – de Haen, Sigma – Aldrich, GmbH
- Kyselina šťavelová, dihydrát, p.a., LACHEMA, odštěpný závod Neratovice, ČR
- Methanol pro kapalinovou chromatografii (LiChrosolv (R)), Merck KGaA, Německo
- Acetonitril, CHROMASOLV, for HPLC, gradient grade, Sigma – Aldrich, GmbH
- Kyselina citronová, p.a., Penta, Chrudim, ČR
- Kyselina octová, p.a., Fluka, Sigma – Aldrich, GmbH
- Kyselina chlorovodíková, p.a., Merci, ČR



### 3.2.2. Standardy

- Amoxicillin, čistota  $\geq 98 \%$ , Fluka, Sigma – Aldrich, GmbH
- Ampicillin, čistota  $\geq 98 \%$ , Fluka, Sigma – Aldrich, GmbH
- Penicillin G, čistota  $\geq 98 \%$ , Fluka, Sigma – Aldrich, GmbH

### 3.3. Sledovaná matrice

- Odpadní voda z čistírny odpadních vod Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, odběry prováděny na přítoku a odtoku v pravidelných intervalech  $2 \times$  denně.
- Odpadní voda z městské velkokapacitní čistírny odpadních vod Brno – Modřice, odběry provedeny na přítoku a odtoku.

### 3.4. Sledované analyty

#### 3.4.1. Penicilin G (benzylpenicilin)

- $C_{16}H_{17}KN_2O_4S$
- kalium-(2*S*,5*R*,6*R*)-6-(fenylacetamido)-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyklo[3.2.0]heptan-2-karboxylát
- $M_r$ : 372,48
- Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek [35].
- Velmi snadno rozpustný ve vodě [35].

#### 3.4.2. Ampicilin

- $C_{16}H_{19}N_3O_4S$
- kyselina (2*S*,5*R*,6*R*)-6-[(2*R*)-2-amino-2-fenylacetamido]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyklo[3.2.0]heptan-2-karboxylová
- $M_r$ : 349,40
- Bílý krystalický prášek [35].
- Mírně rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v acetonu, v lihu, v etheru a v mastných olejích. Rozpouští se ve zředěných roztocích kyselin a alkalických hydroxidů. [35].
- Vykazuje polymorfismus [35].

#### 3.4.3. Amoxicilin

- $C_{16}H_{18}N_3NaO_5S$
- natrium-(2*S*,5*R*,6*R*)-6-[(2*R*)-2-amino-2-(4-hydroxyfenyl)acetamido]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyklo[3.2.0]heptan-2-karboxylát
- $M_r$ : 387,39
- Bílý nebo téměř bílý velmi hygroskopický prášek [35].
- Velmi snadno rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v bezvodém ethanolu, velmi těžce rozpustný v acetonu [35].

### 3.5. Pracovní postupy

#### 3.5.1. Odběry vzorků

*Veterinární a farmaceutická univerzita Brno:*

- přítok a odtok, 2×denně cca 8:00 a 15:00 hod
- 1 litrové tmavé skleněné vzorkovnice
- vzorky ihned zpracovány (3×300 ml), popř. skladovány v lednici při teplotě 8°C do druhého dne

*Městská velkokapacitní čistírna odpadních vod (ČOV) Brno-Modřice:*

- přítok a odtok, odběr proveden 29.4.2008 cca 8:00 hod
- 1 litrové tmavé skleněné vzorkovnice
- vzorky skladovány v lednici při teplotě 8°C do druhého dne a zpracovány

#### 3.5.2. Úprava vzorků a izolace analytů

V případě potřeby byly vzorky přefiltrovány z důvodu odstranění hrubých nečistot. K tomuto účelu byl použit filtr ze skleněných mikrovláken.

300 ml vzorku bylo přečištěno na SPE kolonce C 18 [Obr. 33]:

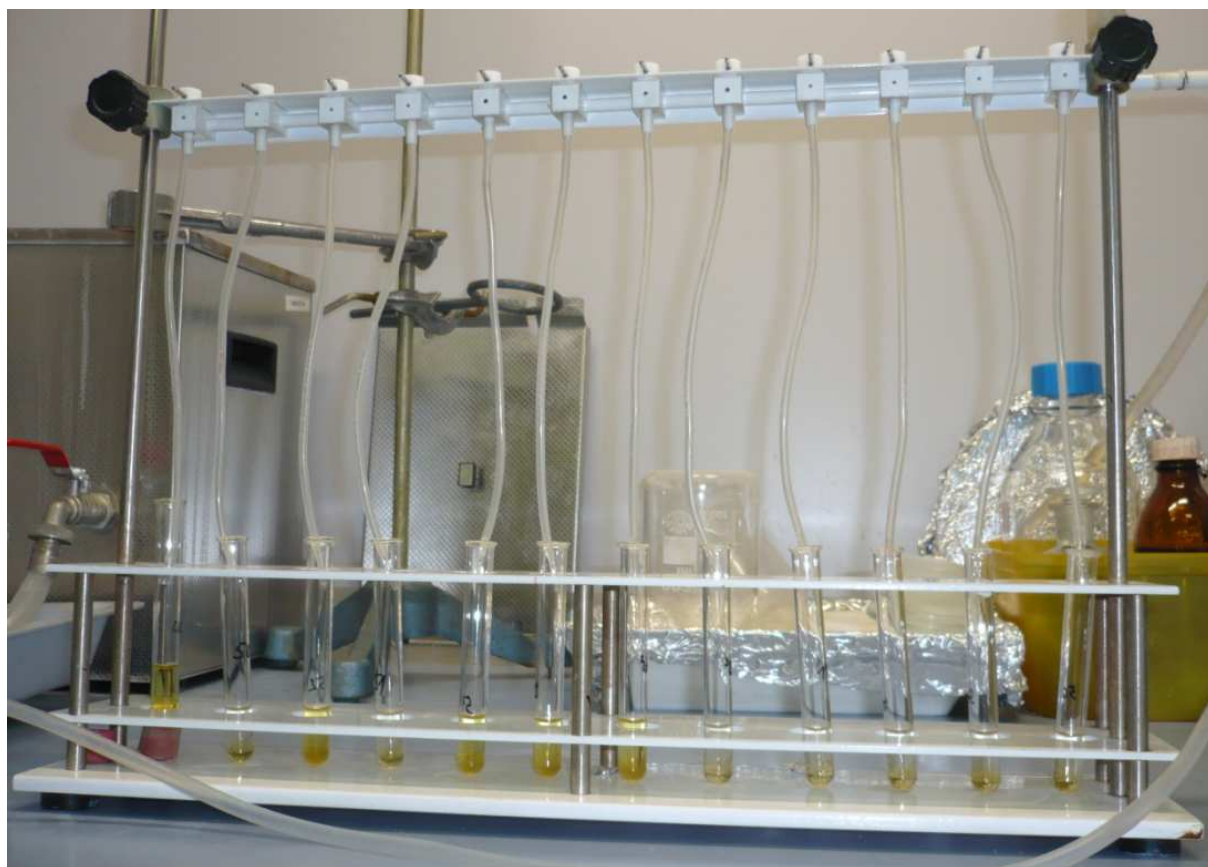
- kondicionace kolonky 3 ml methanolu
- promytí 3 ml 0,5 M HCl
- promytí 3 ml MiliQ vody
- nanesení 300 ml vzorku vody [Obr. 33]
- promytí 3 ml MiliQ vody
- sušení proudem vzduchu (5 minut)
- eluce 2 ml methanolu [Obr. 34]
- zahuštění na 1 ml proudem dusíku [Obr. 35]



*Obrázek č. 33: SPE extrakce – nanesení 300 ml vzorku vody.*



*Obrázek č. 34: SPE extrakce - eluce methanolem.*



*Obrázek č. 35: Zahuštění extraktu proudem dusíku.*

### 3.5.3. Analýza vzorků a standardů

Standardy antibiotik a reálné vzorky byly analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s UV-VIS detektorem typu DAD. Analýza byla provedena na přístroji Agilent 1100 Series [Obr. 36].



*Obrázek č. 36: Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series.*

Analýza byla provedena na koloně Zorbax Eclipse XDB-C18 [Obr. 37]. S touto kolonou je možné pracovat v širokém rozmezí pH od 2 do 9.

Parametry použité kolony Zorbax Eclipse XDB-C18:

- Velikost: 4,6 × 150 mm
- Velikost částic: 5 μm
- Plošný povrch: 180 m<sup>2</sup>/g
- Nejvyšší pracovní teplota: 60°C [93]



**Obrázek č. 37:** Kolona Zorbax Eclipse XDB-C18 s předkolonou.

### 3.5.3.1. Chromatografické podmínky analýzy

- Mobilní fáze: acetonitril; 0,005 M vodný roztok HCOOH
- Průtok mobilní fáze: 1,4 ml/min
- Gradient: viz. Tabulka 2
- Nástřik vzorku: 5 μl
- Teplota kolony: 20°C
- Vlnová délka detekce: 195 nm
- Délka analýzy: 25 min. (15 min. vlastní analýza, 10 min. promývání)

**Tabulka č.2:** Průběh gradientu mobilní fáze.

Čas (min)	0,005 M HCOOH (%)	ACN (%)
0	90	10
6	0	100

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

V této kapitole jsou uvedeny výsledky experimentů provedených s modelovými a reálnými vzorky.

### 4.1. Určení chromatografických podmínek

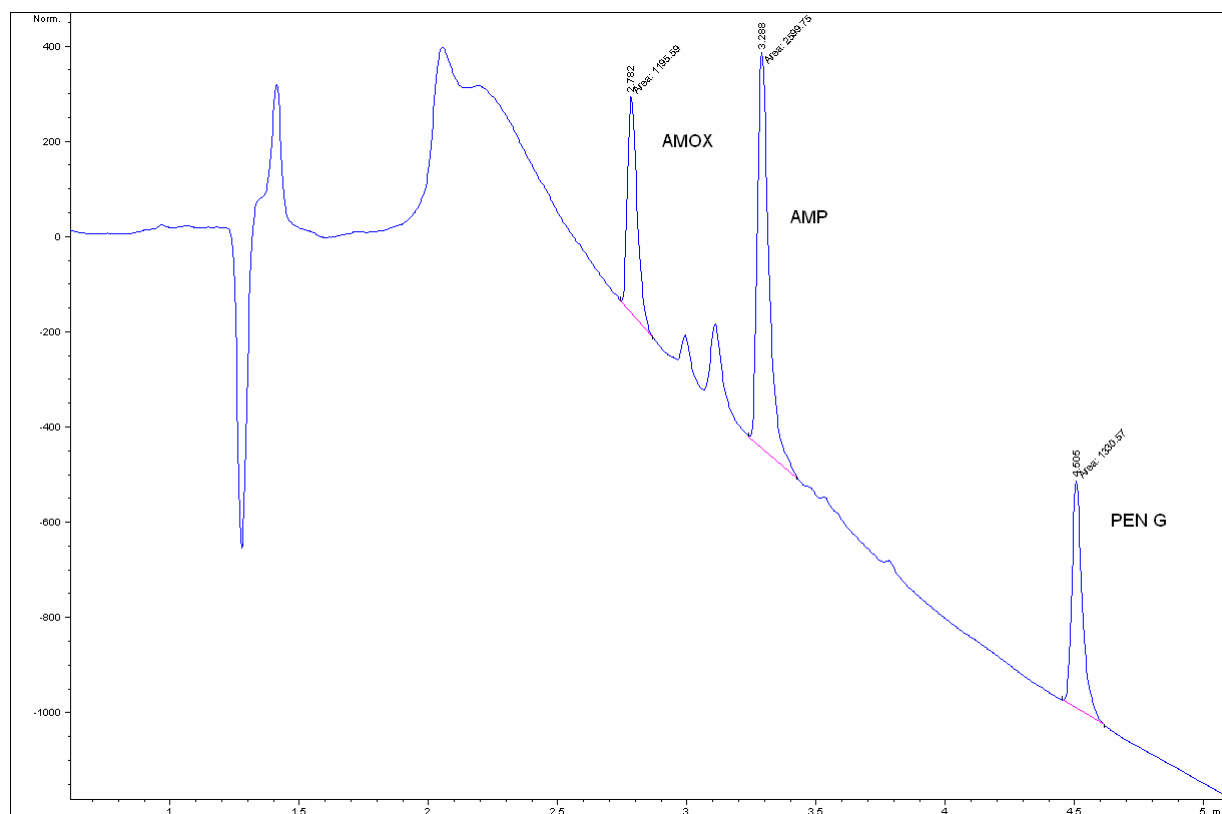
Vhodné podmínky pro stanovení vybraných penicilinů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií byly zkoumány pomocí vodných roztoků standardů.

Modelové vzorky byly připraveny rozpuštěním amoxicilinu, ampicilinu a benzylpenicilinu v miliQ vodě. Koncentrace modelových vzorků byla 0,1 mg/ml.

#### 4.1.1. Mobilní fáze

Nejdříve byl proveden výběr vhodné mobilní fáze. Bylo vyzkoušeno celkem 5 druhů mobilních fází: 0,01 M kyselina citronová (pH 2,5) s acetonitrilem; 0,1% kyselina octová (pH 3,1) s acetonitrilem; 0,1% kyselina mravenčí (pH 2,6) s acetonitrilem; 0,01 M kyselina mravenčí (pH 2,8) s acetonitrilem a 0,005 M kyselina mravenčí (pH 2,9) s acetonitrilem.

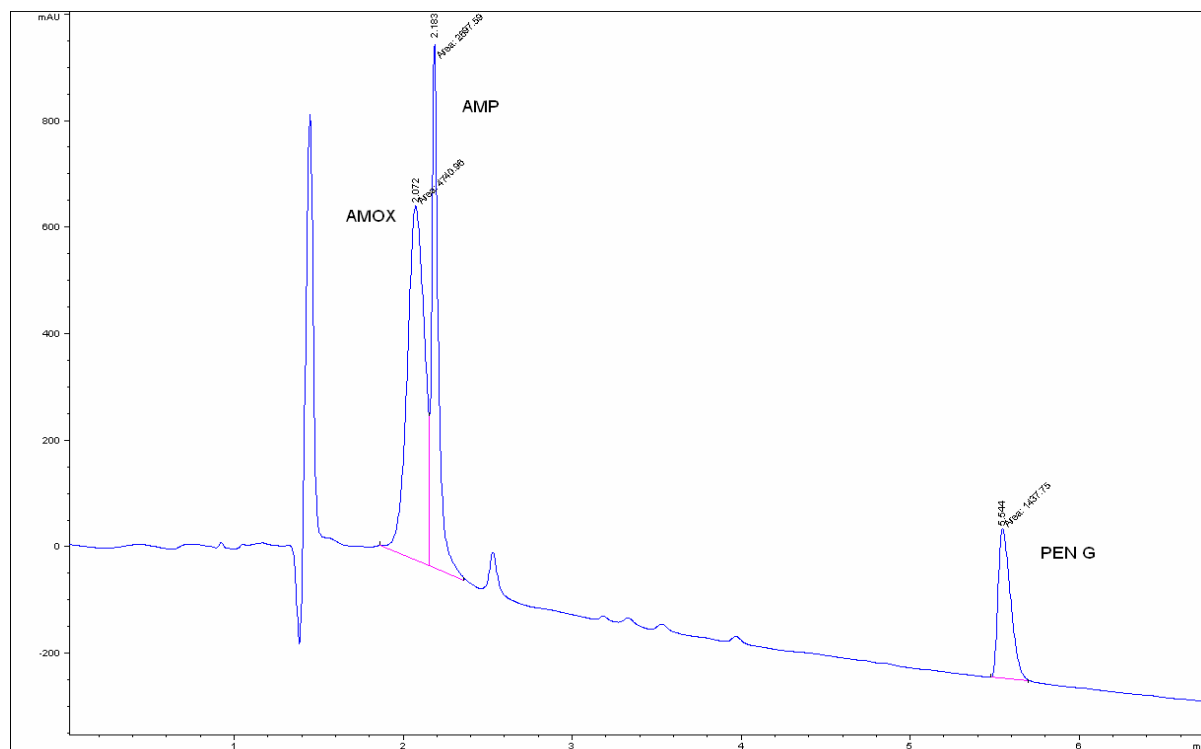
První zkoušenou mobilní fází byla 0,01 M kyselina citronová s acetonitrilem [Obr. 38]. Při použití této mobilní fáze byly píky nesouměrné, což bylo způsobeno pozvolným klesáním (chvostováním) píků. Sestupná tendence signálu je způsobena nastavením gradientu a nízkou vlnovou délkou detekce (195 nm).



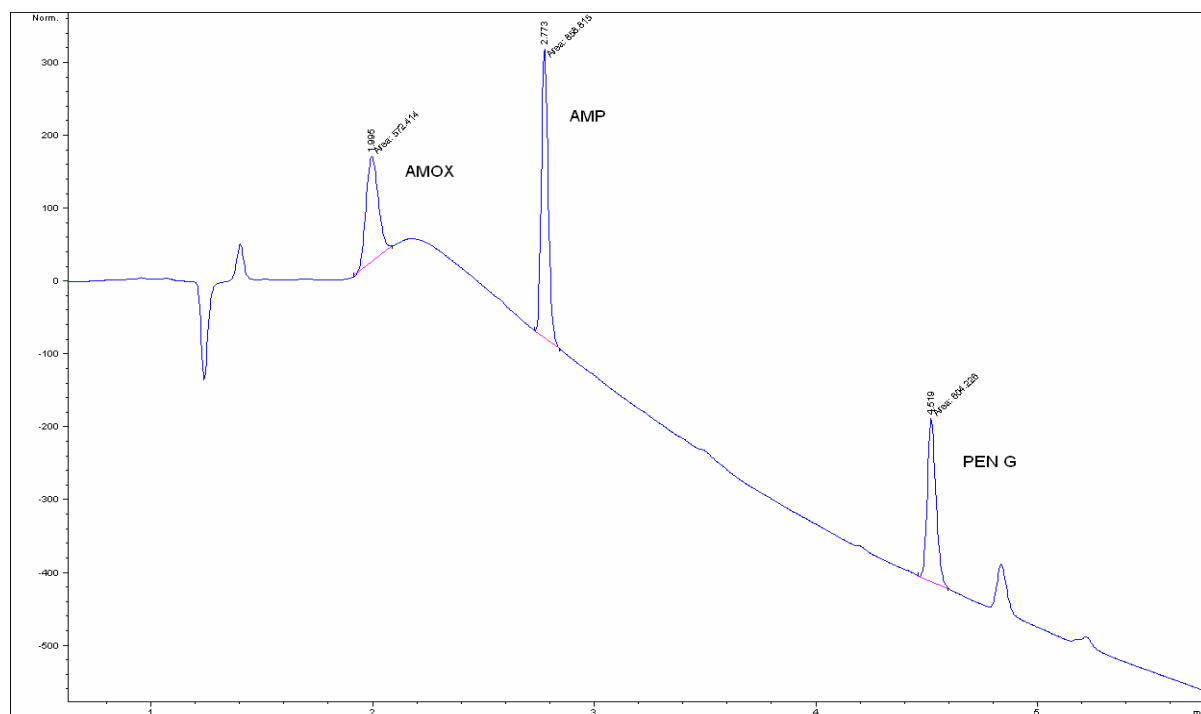
**Obrázek č. 38:** Chromatogram amoxicilinu, ampicilinu a benzylpenicilinu při použití mobilní fáze složené z 0,01 M kyseliny citronové a acetonitrilu.



Na Obr. č. 39 je chromatogram získaný při použití mobilní fáze složené z 0,1% kyseliny octové a acetonitrilu. I tato mobilní fáze byla hodnocena jako nevhodná, protože docházelo ke špatnému rozdělení píků (koeluce). Tvar píků také nebyl optimální. Píky amoxicilinu a penicilinu G jsou široké a chvostují.



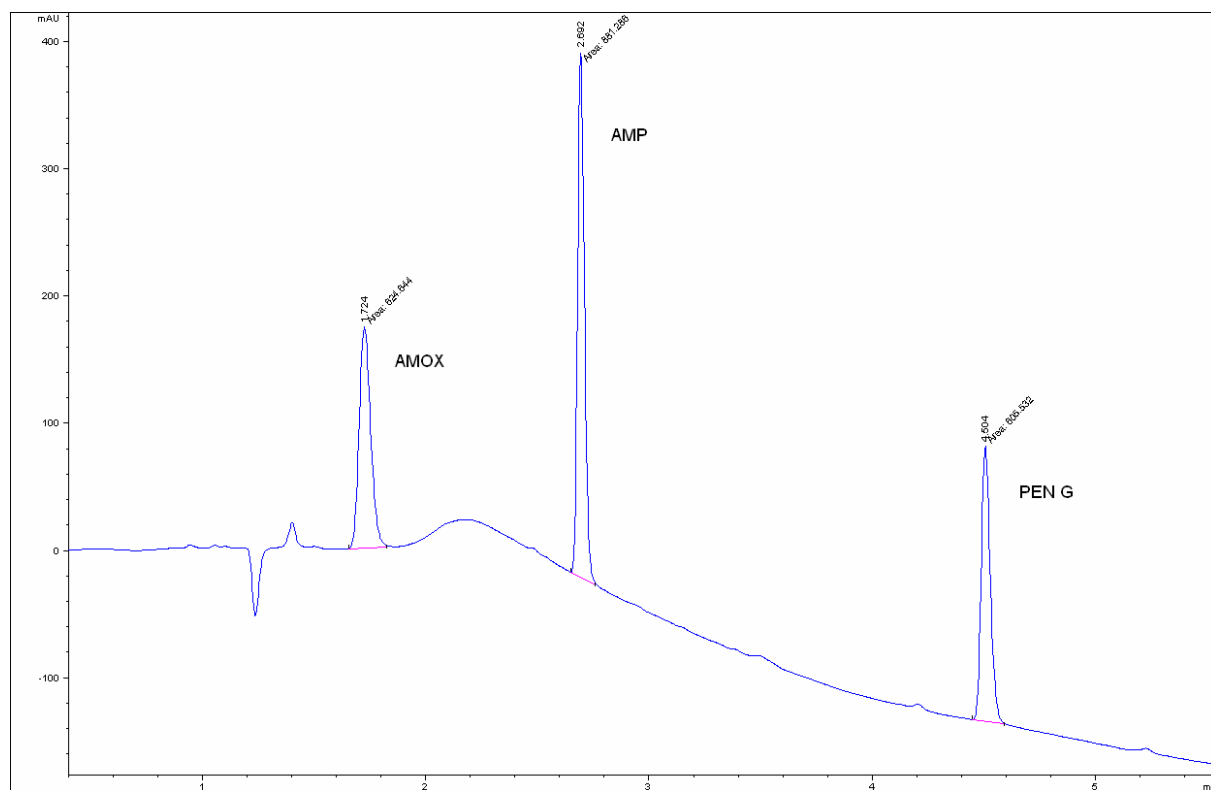
**Obrázek č. 39:** Chromatogram amoxicilinu, ampicilinu a benzylpenicilinu při použití mobilní fáze složené z 0,1% kyseliny octové a acetonitrilu.



**Obrázek č. 40:** Chromatogram amoxicilinu, ampicilinu a benzylpenicilinu při použití mobilní fáze složené z 0,1% kyseliny mravenčí a acetonitrilu.

Další zkoušenou mobilní fází byla 0,1% kyselina mravenčí s acetonitrilem [Obr. 40]. Při použití této mobilní fáze byly píky souměrnější, nebyly však dostatečně ostré. Opět se také objevila sestupná tendence signálu vlivem nastaveného gradientu a nízké vlnové délky detekce.

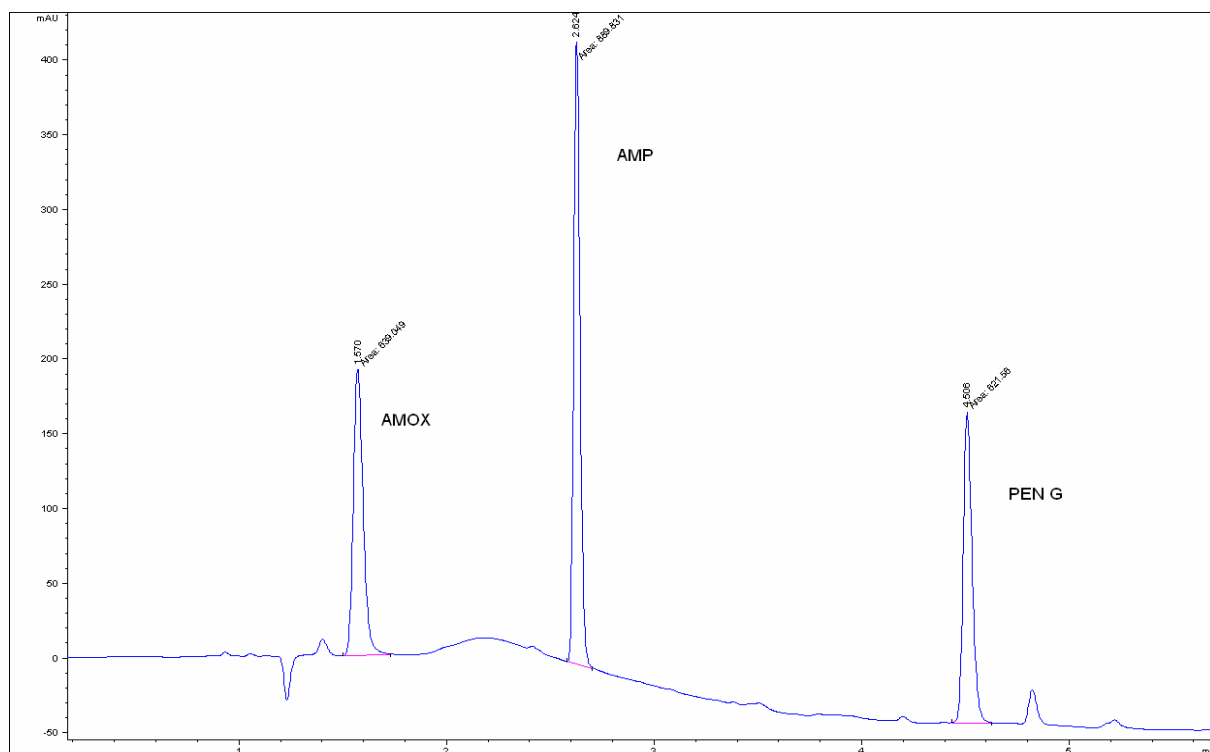
Chromatogram získaný při použití mobilní fáze složené z 0,01 M kyseliny mravenčí a acetonitrilu je znázorněn na Obr. č. 41. Píky ampicilinu a penicilinu G jsou souměrné a ostré, pík amoxicilinu je široký a s malou odezvou.



**Obrázek č. 41:** Chromatogram amoxicilinu, ampicilinu a benzylpenicilinu při použití mobilní fáze složené z 0,01 M kyseliny mravenčí a acetonitrilu.

Jako nejvhodnější byla hodnocena mobilní fáze složená z 0,005M kyseliny mravenčí a acetonitrilu [Obr. 42]. Píky všech tří sledovaných analytů dosahují nejvyšší odezvy, jsou souměrné a ostré. Sestupná tendence signálu základní linie je výrazně snížena. Tato mobilní fáze byla zvolena pro další analýzy.





**Obrázek č. 42:** Chromatogram amoxicilinu, ampicilinu a benzylpenicilinu při použití mobilní fáze složené z 0,005 M kyseliny mravenčí a acetonitrilu.

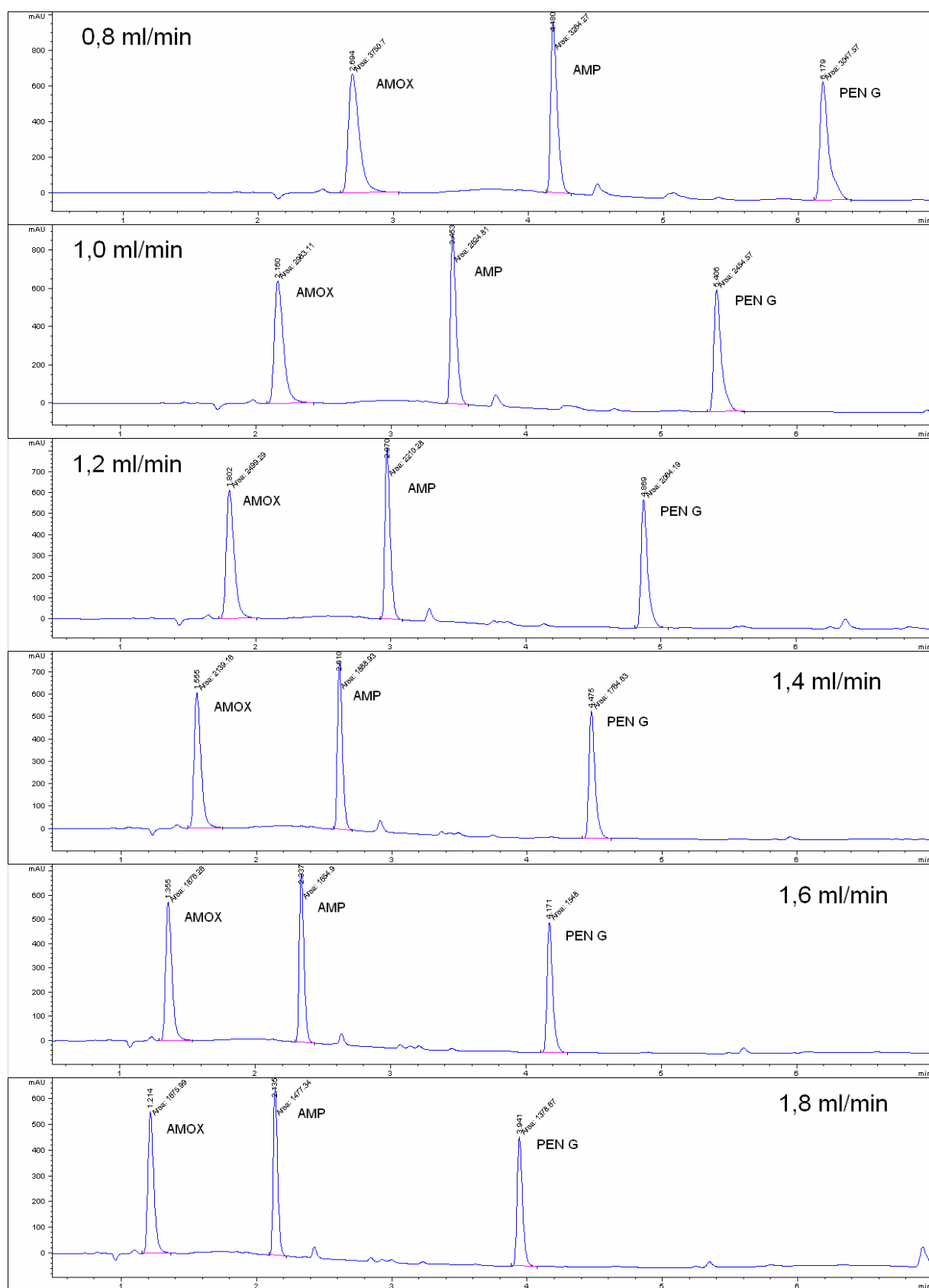
#### 4.1.2. Průtok mobilní fáze

Po zvolení vhodné mobilní fáze byl hledán její optimální průtok. Bylo vyzkoušeno následujících šest průtoků: 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6 a 1,8 ml/min [Obr. 43]. Při změně průtoku mobilní fáze docházelo k posunutí retenčních časů. Retenční časy jednotlivých analytů při zkoušených průtokových rychlostech jsou shrnuty v tabulce č. 3.

**Tabulka č.3:** Retenční časy amoxicilinu, ampicilinu a penicilinu G při různých průtocích mobilní fáze.

Průtok (ml/min)	Retenční čas		
	Amoxicilin	Ampicilin	Penicilin G
0,8	2,694	4,180	6,179
1,0	2,160	3,453	5,406
1,2	1,802	2,970	4,869
1,4	1,555	2,610	4,475
1,6	1,355	2,337	4,171
1,8	1,214	2,135	3,941

Při nízkých průtokových rychlostech mobilní fáze byly píky široké a rozmyté. Se zvyšujícím se průtokem se šířka píku snižovala a rostla výška píku. S rostoucím průtokem klesalo také rozmytí píků. Jako optimální průtok byla vybrána hodnota 1,4 ml/min. Při této hodnotě průtoku jsou píky sledovaných analytů ostré, souměrné a dosahují nejvyšší odezvy. S dalším zvyšováním průtoku byly píky také souměrné a ostré, ale klesala již odezva detektoru.



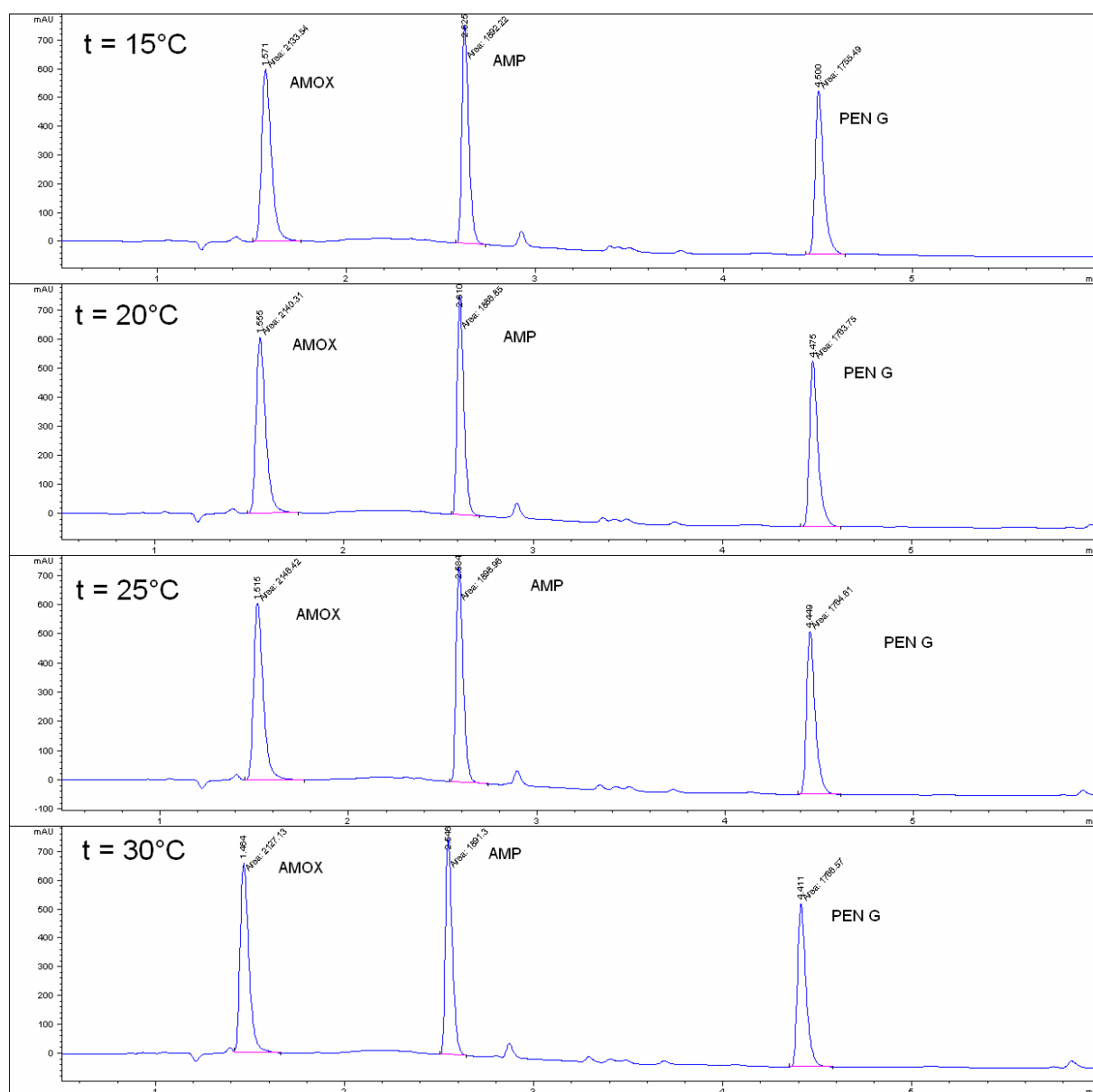
**Obrázek č. 43:** Chromatogramy amoxicilinu, ampicilinu a benzylpenicilinu při různých průtocích.

### 4.1.3. Gradient mobilní fáze

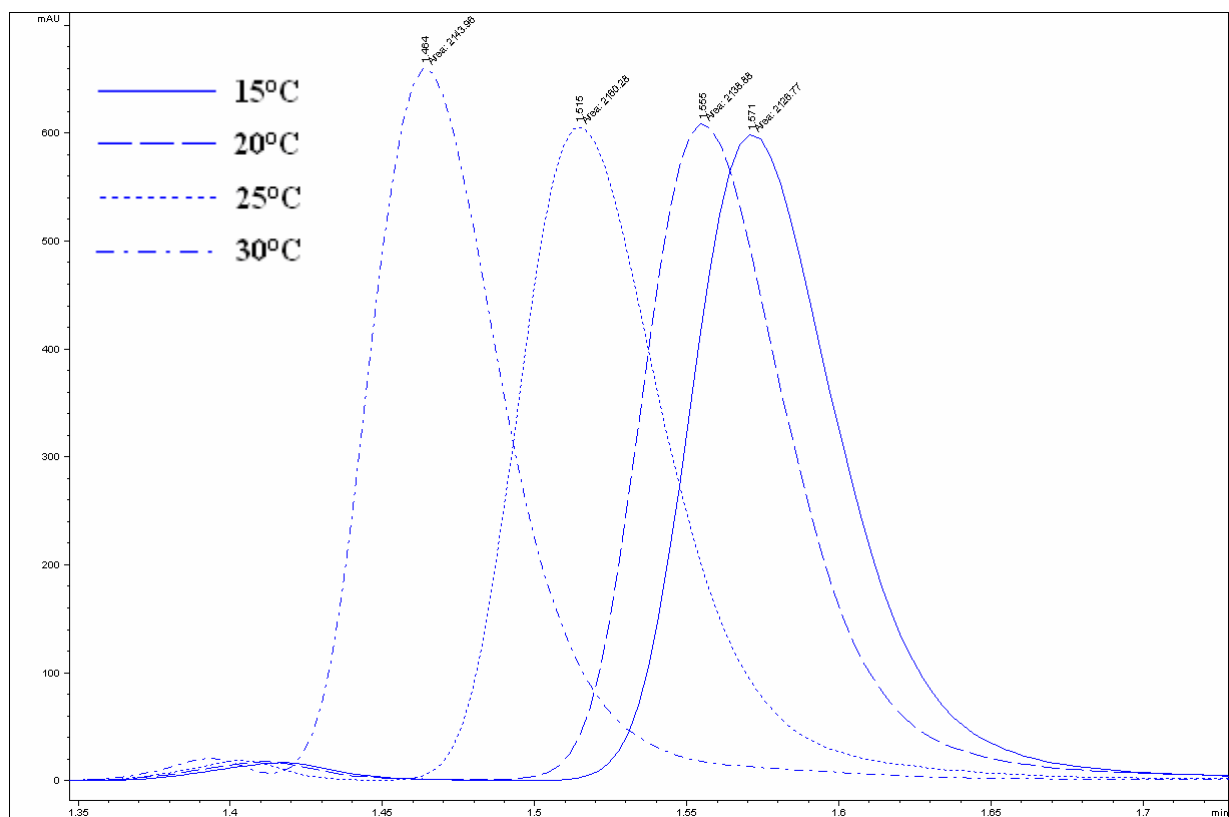
Parametrem, který významně ovlivňuje analýzu je průběh gradientu mobilní fáze. Bylo vyzkoušeno několik variant, ze kterých byl vybrán průběh gradientu uvedený v kapitole 3.5.3.1. [Tab. 2].

### 4.1.4. Teplota kolony

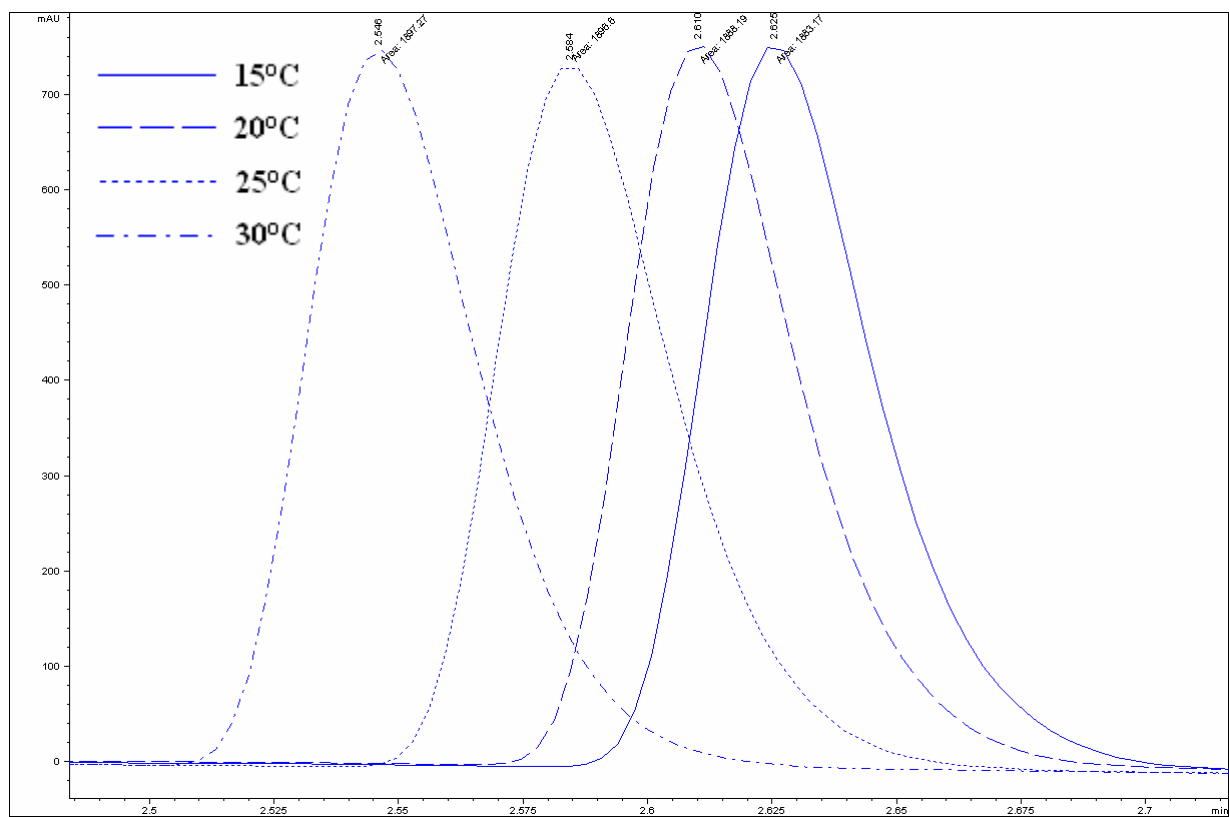
Dalším faktorem ovlivňujícím analýzu je teplota kolony. Bylo vyzkoušeno několik teplot kolony v rozmezí 15-30 °C [Obr. 44]. Se změnou teploty kolony došlo k mírnému posunutí retenčních časů jednotlivých analytů [Obr. 45, 46 a 47]. Pro další stanovení byla vybrána teplota kolony 20 °C. Při této teplotě píky méně chvostují a mají dobrou odezvu. Tato teplota byla zvolena také s ohledem na vlastnosti stanovovaných látek, které při vyšších teplotách degradují.



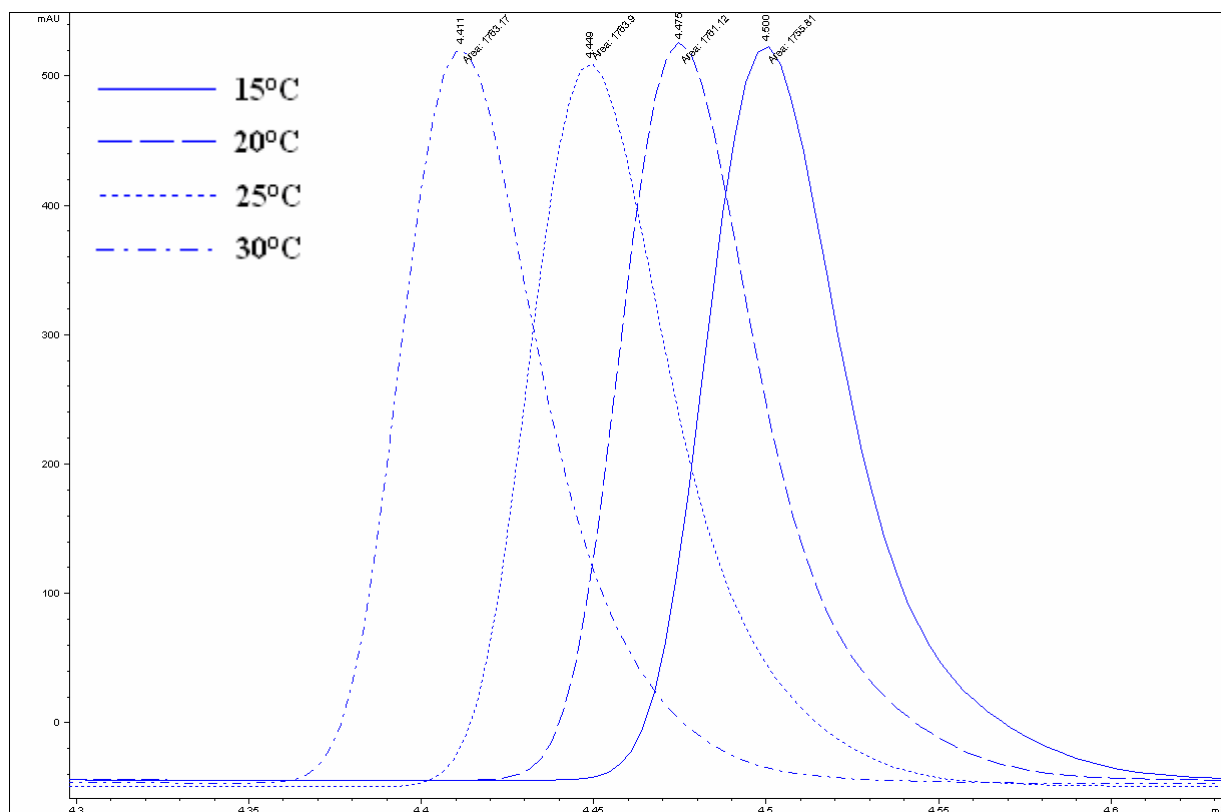
**Obrázek č. 44:** Chromatogramy amoxicilinu, ampicilinu a benzylpenicilinu při různých teplotách kolony.



**Obrázek č. 45:** Detail píku amoxicilinu při různých teplotách kolony.



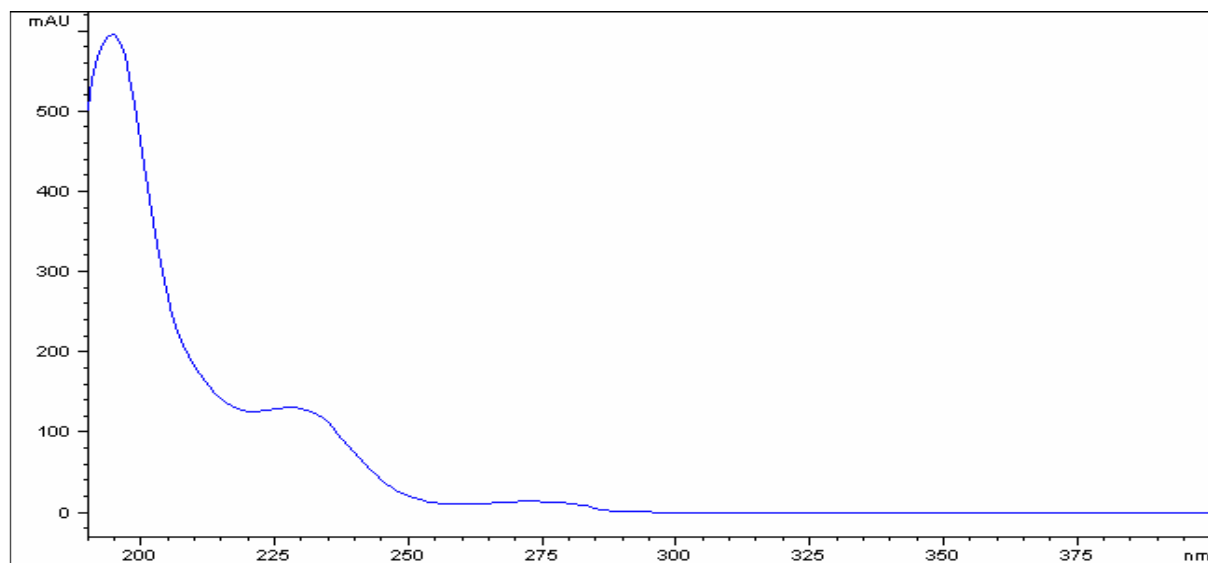
**Obrázek č. 46:** Detail píku ampicilinu při různých teplotách kolony.



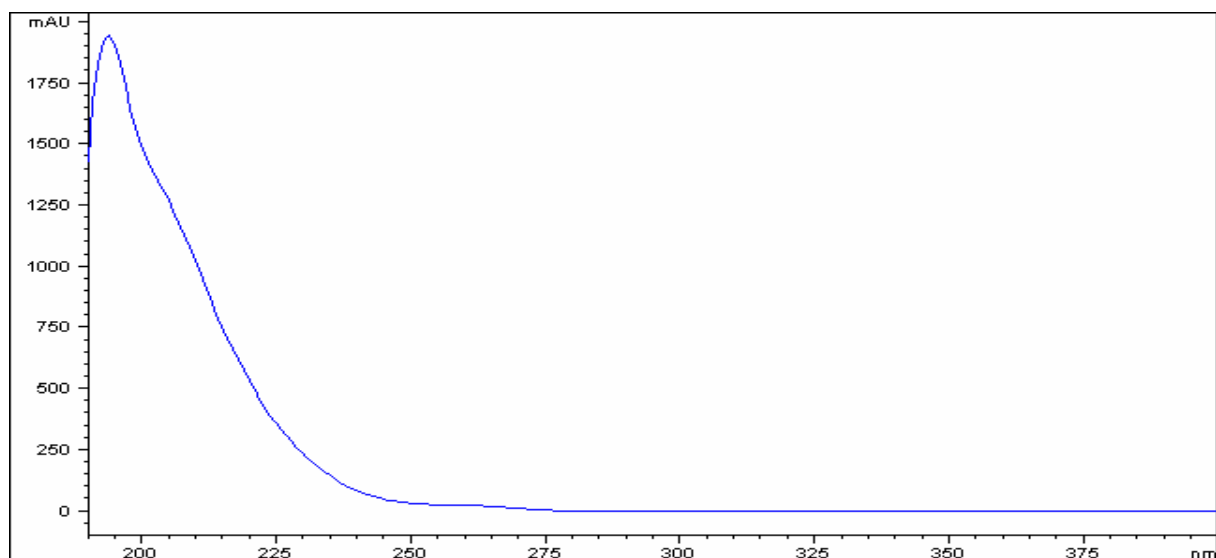
**Obrázek č. 47:** Detail píku penicilinu G při různých teplotách kolony.

#### 4.1.5. Vlnová délka detekce

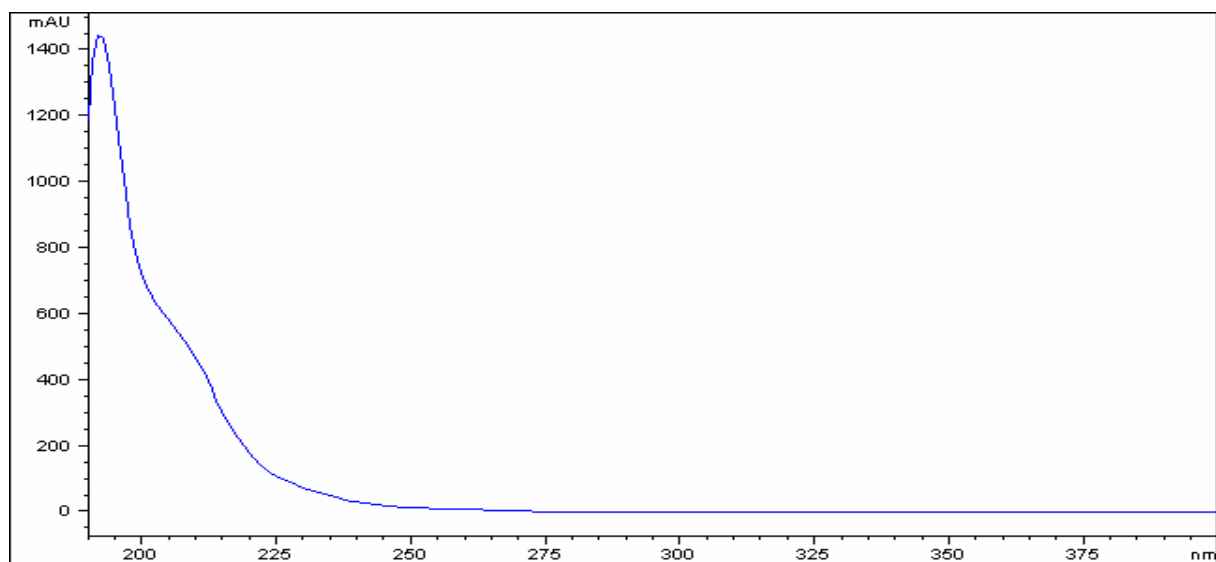
Byla také zkoumána optimální vlnová délka vhodná pro stanovení všech tří studovaných látek. Na Obr. č 48, 49 a 50 jsou znázorněna absorpční spektra jednotlivých antibiotik získaná proměřením modelových vzorků. Absorpční maximum amoxicilinu je 197 nm. Pro ampicilin je to pak 195 nm a pro penicilin G 193 nm. Jako optimální vlnová délka pro stanovení byla zvolena hodnota 195 nm, kdy ampicilin dosahuje svého absorpčního maxima a absorpce dalších dvou analytů je také dostatečně vysoká.



**Obrázek č. 48:** Absorpční spektrum amoxicilinu.



*Obrázek č. 49: Absorpční spektrum ampicilinu.*



*Obrázek č. 50: Absorpční spektrum penicilinu G (benzylpenicilinu).*

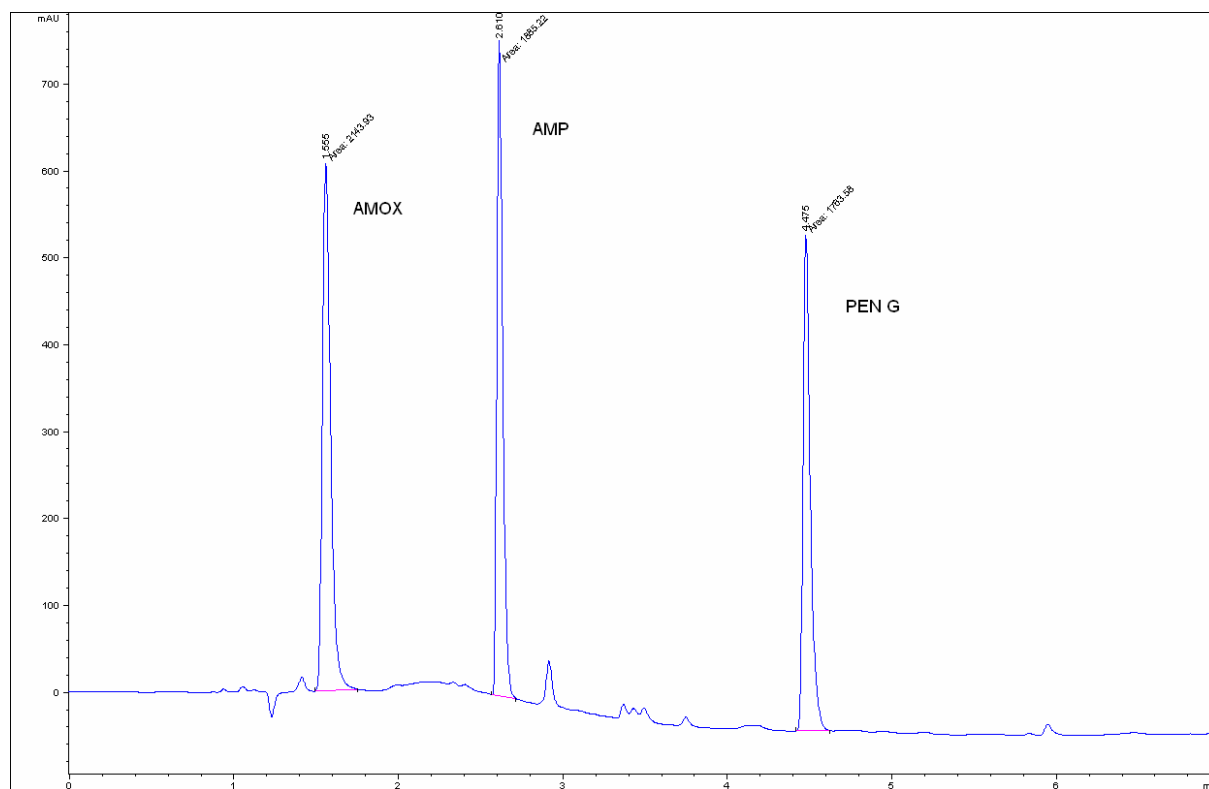
#### 4.1.6. Parametry analýzy při zvolených optimálních podmínkách

Při výše uvedených podmínkách analýzy byly získány ostré a dobře separované píky všech tří analyzovaných látek [Obr. 51]. Dosažené retenční časy jednotlivých analytů jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Celková doba analýzy dosáhla 25 minut. Doba vlastní analýzy činila 15 minut a následné promývání 10 minut. Promývání je při gradientové eluci nezbytné z důvodu ustálení tlaku a signálu.

**Tabulka č.4:** Retenční časy zkoumaných analytů.

Sloučenina	Retenční čas (min)
Amoxicilin	1,57
Ampicilin	2,62
Benzylpenicilin	4,51



**Obrázek č. 51:** Chromatogram amoxicilinu, ampicilinu a benzylpenicilinu při optimálních podmínkách.

## 4.2. Úprava vzorku před vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

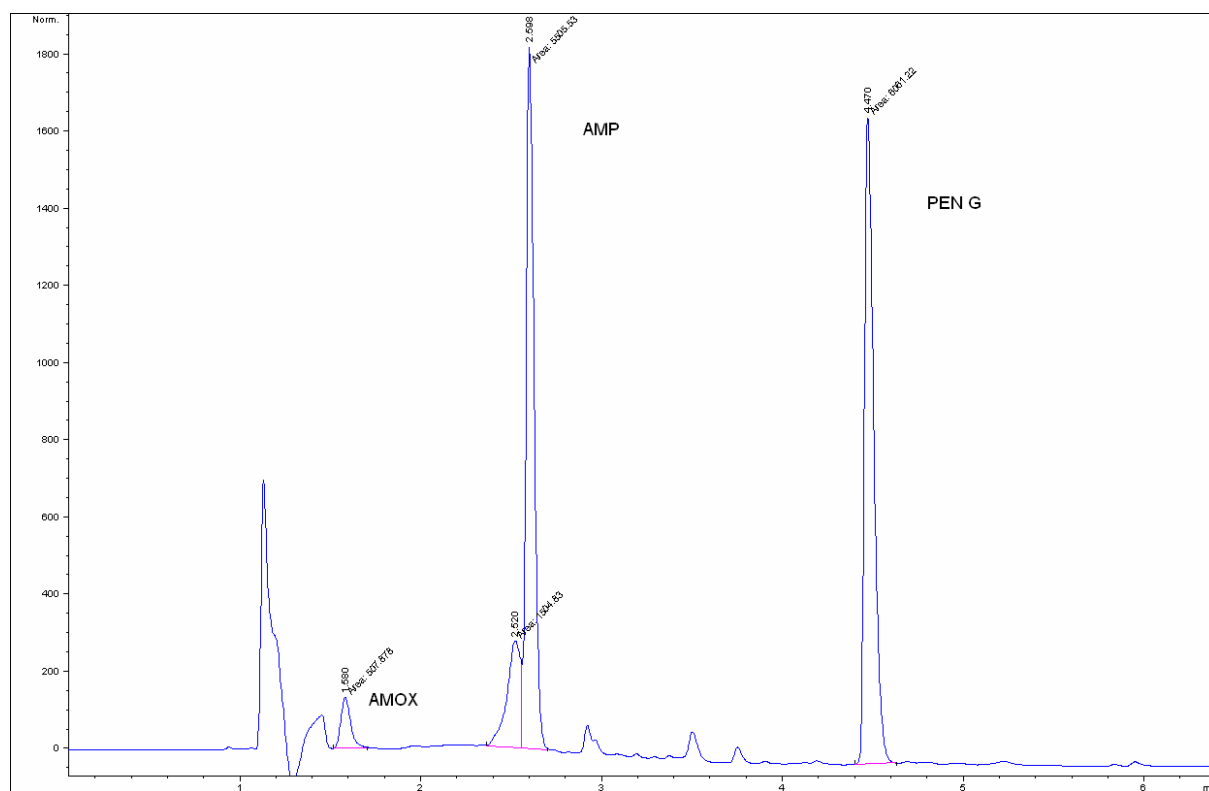
Metoda úpravy vzorku před vlastním stanovením byla hledána a ověřena pomocí modelového vzorku. Modelový vzorek byl připraven rozpuštěním amoxicilinu, ampicilinu a benzylpenicilinu ve miliQ vodě. Koncentrace všech tří sledovaných látek v modelovém vzorku byla 0,1 mg/ml.

Hodnoty koncentrací po provedené úpravě vzorků byly určeny pomocí metody vícebodové kalibrační křivky [Obr. 55, 56 a 57].

### 4.2.1. SPE Extrakce

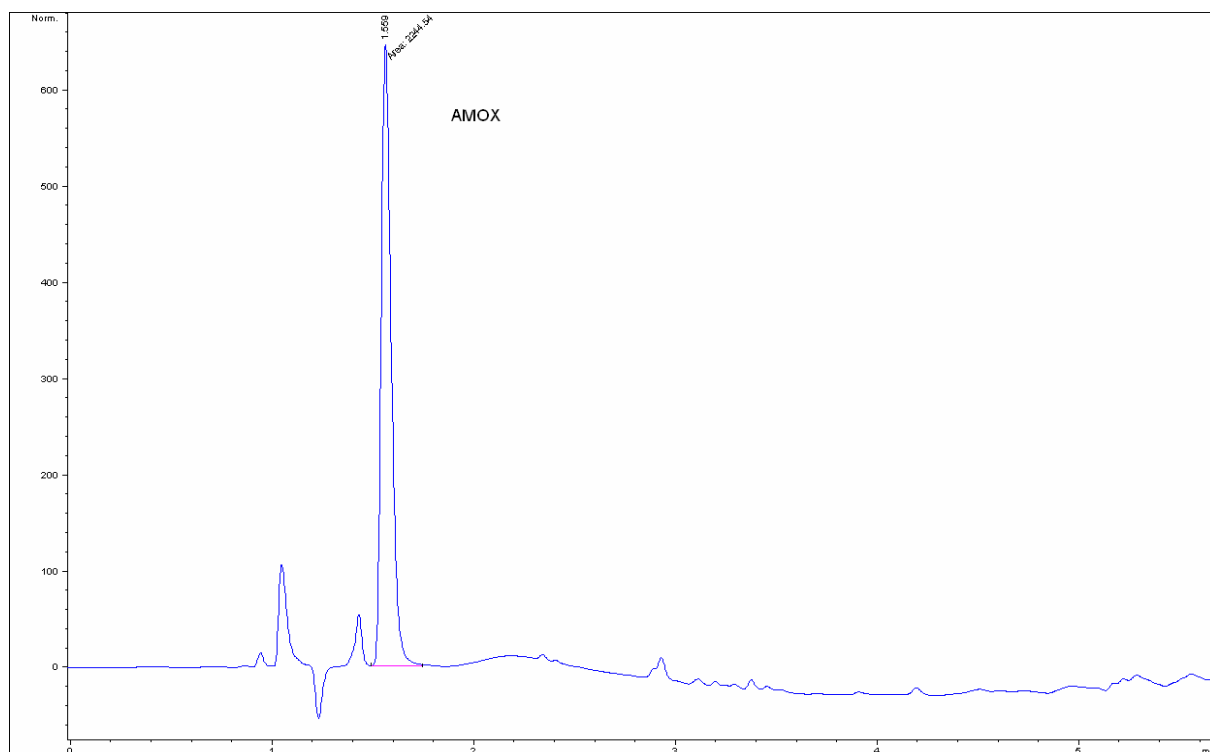
Vhodné podmínky SPE extrakce byly hledány a ověřovány na připraveném modelovém vzorku. Nejprve byly zkoušeny vhodné SPE kolony. Byly vyzkoušeny dva druhy SPE kolonek, kolony Strata C18, Phenomenex, 500mg/6ml a kolony Bakerbond C18, 500mg/3ml.

Při použití SPE kolonek Strata dosahovala výtěžnost ampicilinu a penicilinu G téměř 100 %, avšak výtěžnost amoxicilinu byla velice nízká, řádově 5 – 10 % [Obr. 52]. Při proměření všech frakcí vznikajících při SPE extrakci bylo zjištěno, že amoxicilin se na sorbentu této SPE kolony nezachycuje, ale je vymýván současně se vzorkem vody [Obr. 53].



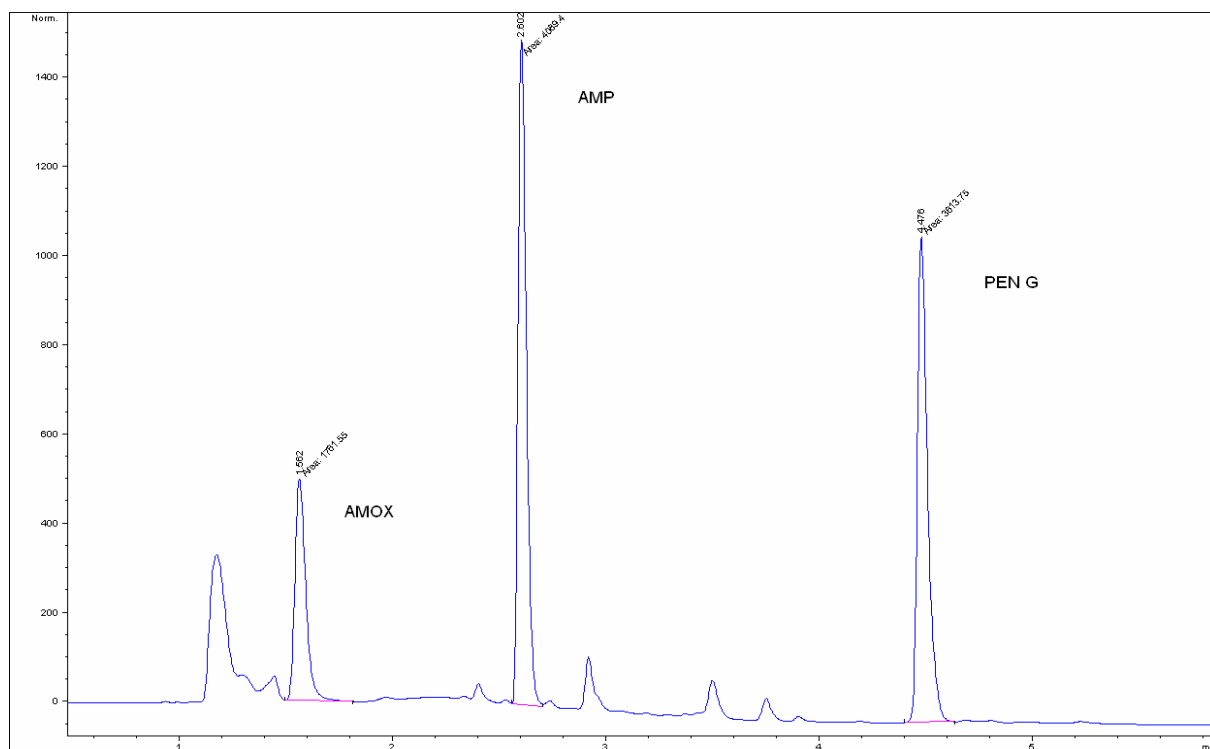
**Obrázek č. 52:** Výtěžnost amoxicilinu, ampicilinu a benzylpenicilinu na SPE kolonkách Strata C18.





**Obrázek č. 53:** Chromatogram vodné frakce vzorku při SPE extrakci na SPE kolonkách Strata C18.

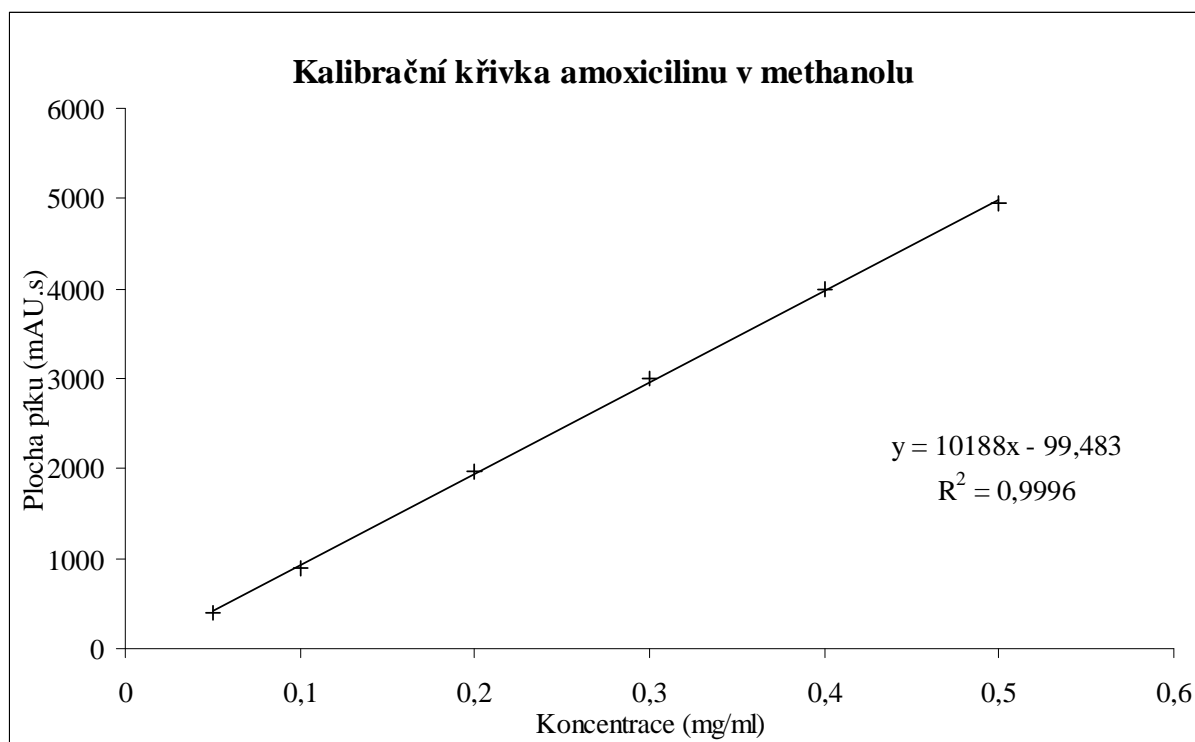
Protože SPE kolonky Strata C18 nebyly pro extrakci všech tří analytů vyhovující, byly vyzkoušeny kolonky Bakerbond C18. Při extrakci na těchto kolonkách se výtěžnost amoxicilinu výrazně zvýšila (přibližně 90 %) [Obr. 54]. Proto byly tyto kolonky vybrány jako vhodné k dalším stanovením.



**Obrázek č. 54:** Výtěžnost amoxicilinu, ampicilinu a benzylpenicilinu na SPE kolonkách Bakerbond C18.

#### 4.2.2. Výtěžnost amoxicilinu

Výtěžnost metody byla vyhodnocena pomocí kalibrační závislosti plochy píku na koncentraci látky. Kalibrační roztoky byly připraveny rozpuštěním standardu amoxicilinu v methanolu. Kalibrace v methanolu byla použita, protože methanol jako eluční činidlo zvyšoval odezvu.



**Obrázek č. 55:** Kalibrační křivka amoxicilinu v methanolu.

Výtěžnost amoxicilinu byla ověřena dle postupu uvedeného v kapitole 3.5.2. Místo 300 ml reálného vzorku bylo dávkováno 5 ml standardu o koncentraci 0,1 mg/ml. Eluce byla provedena 2 ml methanolu. Výsledná koncentrace byla vztažena na 1 ml dávkovaného standardu.

**Tabulka č.5:** Výtěžnost modelových vzorků amoxicilinu.

Číslo vzorku	Původní koncentrace (mg/ml)	Výsledná koncentrace (mg/ml)	Výtěžnost (%)
1	0,100	0,094	94,0
2	0,100	0,083	83,2
3	0,100	0,095	94,7
4	0,100	0,095	95,3
5	0,100	0,090	90,2
6	0,100	0,087	86,5
7	0,100	0,090	89,9
8	0,100	0,099	98,6
9	0,100	0,093	92,5
10	0,100	0,090	89,6

Výtěžnosti amoxicilinu se pohybovaly v rozmezí 83,2 – 98,6 %. Průměrná výsledná koncentrace byla stanovena na 0,091 mg/ml a průměrná výtěžnost dosáhla 91,4 %. Rozptýlení jednotlivých hodnot okolo průměru je charakterizováno hodnotou směrodatné odchylky, která činila 0,004 mg/ml. Dále byla počítána relativní směrodatná odchylka (RSD) dle vztahu (1):

$$RSD = \frac{2 \cdot \sigma_n \cdot 100}{\bar{x}} \quad (1)$$

kde:  $\sigma_n$  je směrodatná odchylka a  $\bar{x}$  aritmetický průměr.

Hodnota relativní směrodatné odchylky dosáhla hodnoty 9,4 %.

Rozptyl naměřených hodnot byl  $2 \cdot 10^{-5}$ .

Průměrná ztráta na vzorek činila 8,6 % což odpovídá 0,009 mg.

Dále byla počítána mez detekce a mez stanovitelnosti. Pro výpočet meze detekce (LOD = limit of detection) byl použit vztah (2) a mez stanovitelnosti (LOQ = limit of quantification) byla vypočtena dle vztahu (3):

$$LOD = \frac{3 \cdot H_s}{k} \quad (2)$$

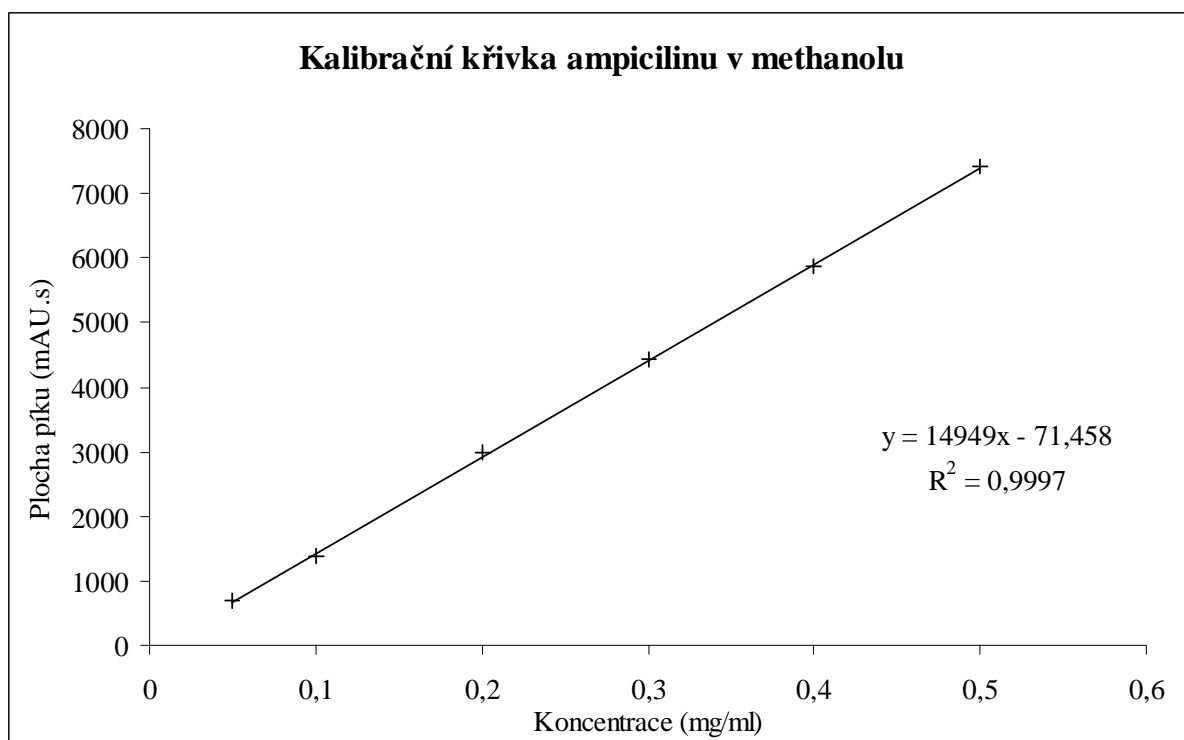
$$LOQ = \frac{10 \cdot H_s}{k} \quad (3)$$

kde:  $H_s$  je velikost šumu základní linie zjištěná analýzou slepého pokusu a  $k$  je směrnice kalibrační přímky.

Vypočtená mez detekce měla hodnotu 7,46 ng/ml a mez stanovitelnosti 24,86 ng/ml.

#### 4.2.3. Výtěžnost ampicilinu

Výtěžnost metody byla vyhodnocena pomocí kalibrační závislosti plochy píku na koncentraci látky. Kalibrační roztoky byly připraveny rozpuštěním standardu ampicilinu v methanolu. Kalibrace v methanolu byla použita, protože methanol jako eluční činidlo zvyšoval odezvu.



**Obrázek č. 56:** Kalibrační křivka ampicilinu v methanolu.

Výtěžnost ampicilinu byla zkoušena dle postupu uvedeného v kapitole 3.5.2. Místo 300 ml reálného vzorku bylo dávkováno 5 ml standardu o koncentraci 0,1 mg/ml. Eluce byla provedena 2 ml methanolu. Výsledná koncentrace byla vztažena na 1 ml dávkovaného standardu.

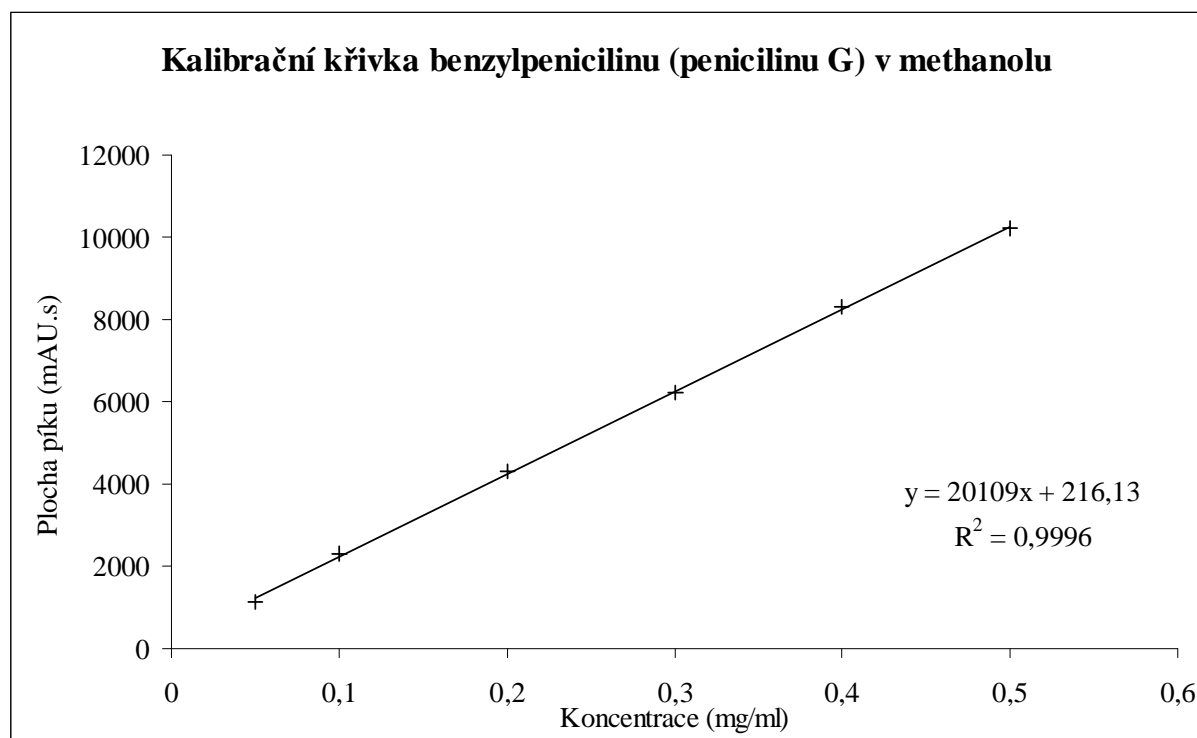
**Tabulka č.6:** Výtěžnost modelových vzorků ampicilinu.

Číslo vzorku	Původní koncentrace (mg/ml)	Výsledná koncentrace (mg/ml)	Výtěžnost (%)
1	0,100	0,090	89,6
2	0,100	0,091	91,0
3	0,100	0,094	94,3
4	0,100	0,101	101,4
5	0,100	0,091	90,7
6	0,100	0,092	91,6
7	0,100	0,102	102,3
8	0,100	0,095	94,6
9	0,100	0,091	90,7
10	0,100	0,100	100,3

Výtěžnosti ampicilinu se pohybovaly v rozmezí 89,6 – 102,3 %. Průměrná výsledná koncentrace byla stanovena na 0,095 mg/ml a průměrná výtěžnost dosáhla 94,7 %. Hodnota směrodatné odchylky činila 0,005 mg/ml. Relativní směrodatná odchylka dosáhla hodnoty 9,8 %. Rozptyl naměřených hodnot byl  $2 \cdot 10^{-5}$  a průměrná ztráta na vzorek činila 5,3 %, což odpovídá 0,005 mg. Vypočtená mez detekce měla hodnotu 2,65 ng/ml a mez stanovitelnosti 8,83 ng/ml.

#### 4.2.4. Výtěžnost penicilinu G (benzylpenicilinu)

Výtěžnost metody byla vyhodnocena pomocí kalibrační závislosti plochy píku na koncentraci látky. Kalibrační roztoky byly připraveny rozpuštěním standardu penicilinu G v methanolu. Kalibrace v methanolu byla použita, protože methanol jako eluční činidlo zvyšoval odezvu.



Obrázek č. 57: Kalibrační křivka penicilinu G v methanolu.

Výtěžnost penicilinu G byla zkoušena dle postupu uvedeného v kapitole 3.5.2. Místo 300 ml reálného vzorku bylo dávkováno 5 ml standardu o koncentraci 0,1 mg/ml. Eluce byla provedena 2 ml methanolu. Výsledná koncentrace byla vztažena na 1 ml dávkovaného standardu.

Tabulka č.7: Výtěžnost modelových vzorků penicilinu G.

Číslo vzorku	Původní koncentrace (mg/ml)	Výsledná koncentrace (mg/ml)	Výtěžnost (%)
1	0,100	0,088	88,4
2	0,100	0,091	90,5
3	0,100	0,092	91,5
4	0,100	0,092	92,2
5	0,100	0,091	90,7
6	0,100	0,092	91,6
7	0,100	0,096	96,1
8	0,100	0,090	89,9
9	0,100	0,095	94,6
10	0,100	0,091	91,1

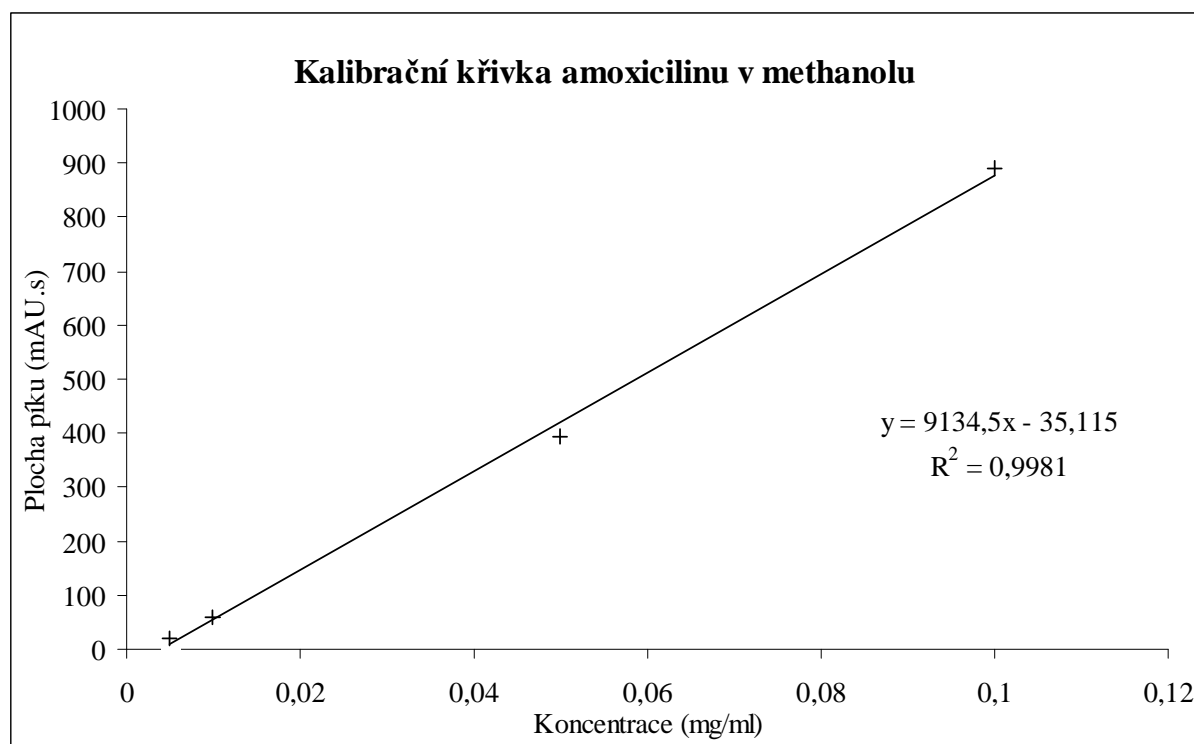
Výtěžnosti penicilinu G se pohybovaly v rozmezí 88,36 – 94,60 %. Průměrná výsledná koncentrace byla stanovena na 0,0917 mg/ml a průměrná výtěžnost dosáhla 91,65 %. Hodnota směrodatné odchylky činila 0,0021 mg/ml. Relativní směrodatná odchylka dosáhla hodnoty 4,58 %. Rozptyl naměřených hodnot je  $5,02 \cdot 10^{-6}$  a průměrná ztráta na vzorek činila 8,35 % což odpovídá 0,0076 mg. Vypočtená mez detekce měla hodnotu 4,77 ng/ml a mez stanovitelnosti 15,90 ng/ml.

### 4.3. Reálné vzorky

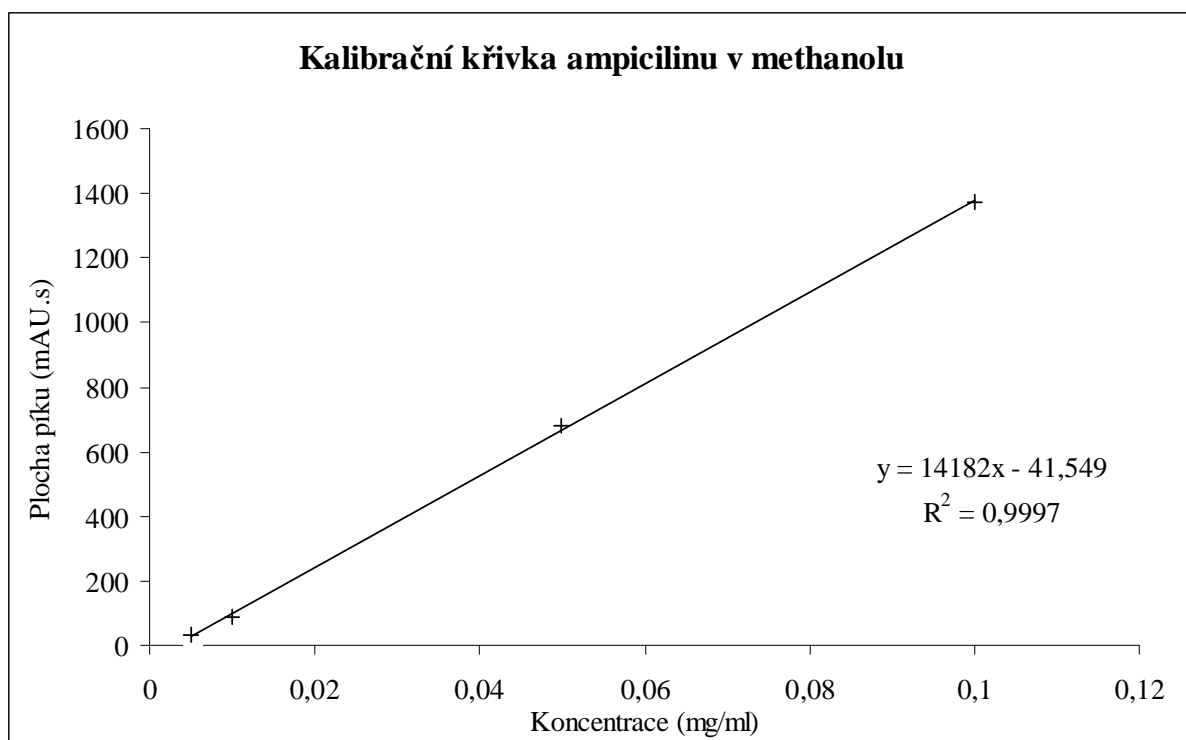
Reálné vzorky byly odebírány na čistírně odpadních vod Veterinární a farmaceutické univerzity Brno. Vzorky byly odebírány 2 × denně (cca 8:00 a 15:00 hod) na přítoku a odtoku. Tato odběrová místa byla zvolena z důvodu ověření účinnosti uvedených čistíren odpadních vod.

Odebrané vzorky byly upraveny podle metody uvedené v kapitole 3.5.2. a byly analyzovány optimalizovanou metodou uvedenou v kapitole 3.5.3.1.

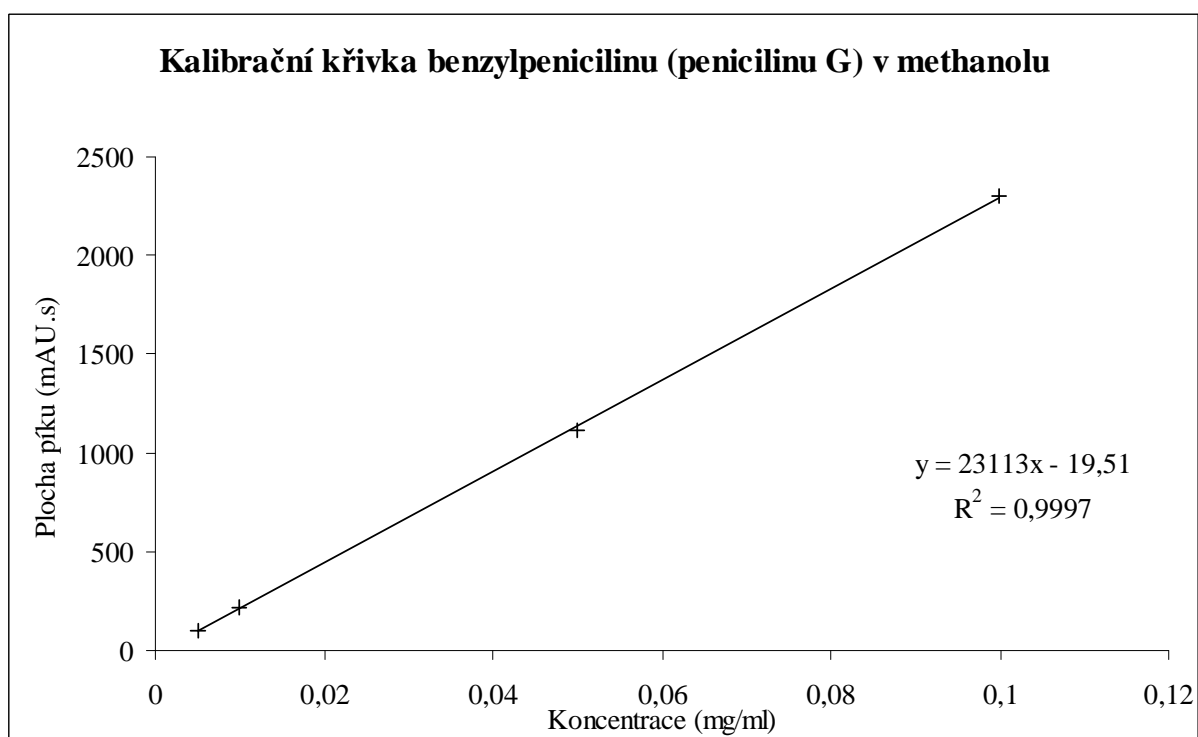
Díky nízkým hodnotám koncentrací sledovaných analytů v odpadní vodě musely být sestaveny nové kalibrační křivky [Obr. 58, 59 a 60]. Tyto kalibrační křivky byly použity k výpočtu koncentrací v reálných vzorcích.



**Obrázek č. 58:** Kalibrační křivka pro stanovení amoxicilinu v reálných vzorcích



**Obrázek č. 59:** Kalibrační křivka pro stanovení ampicilinu v reálných vzorcích



**Obrázek č. 60:** Kalibrační křivka pro stanovení penicilinu G v reálných vzorcích

Protože koncentrace sledovaných analytů ve vzorcích odpadní vody byly velmi nízké, byly vzorky vyhodnoceny metodou standardního přídávku.

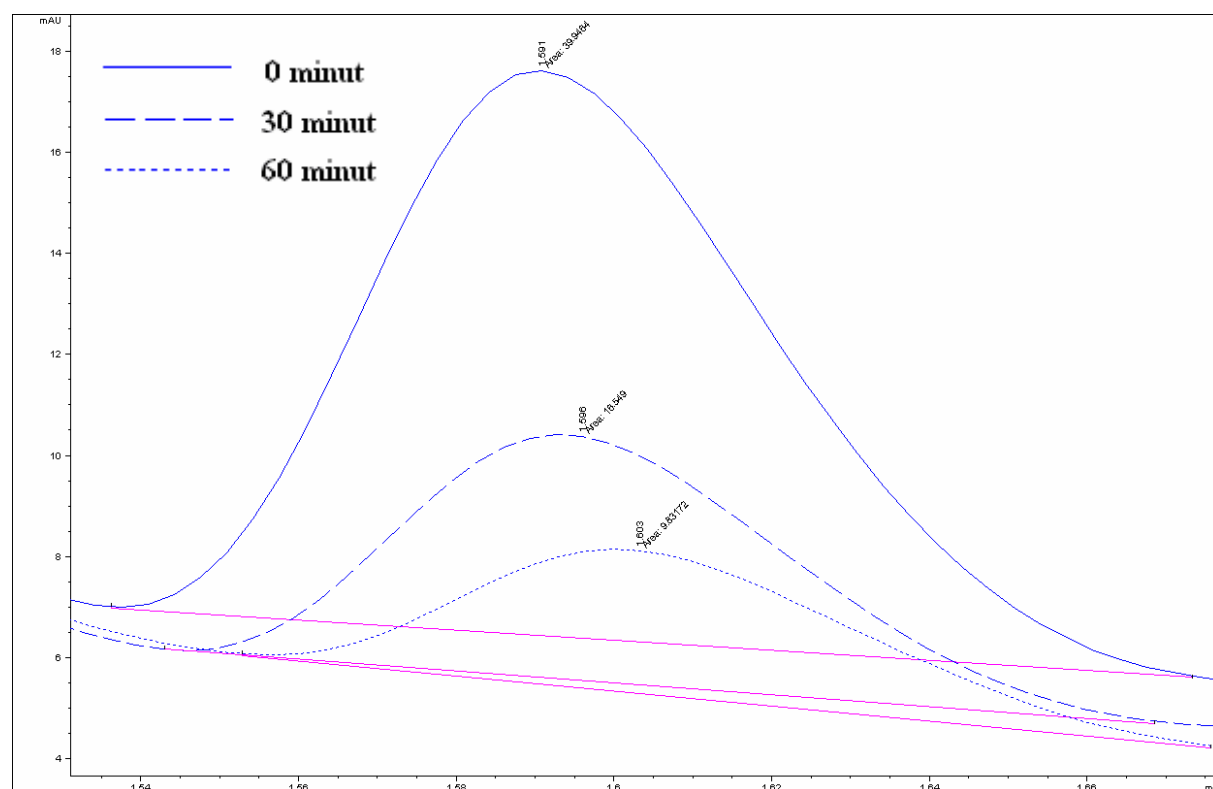
Analýzou reálných vzorků s přídávkem standardu bylo zjištěno, že amoxicilin a ampicilin jsou v reálném vzorku velmi nestabilní. Odbourání přidaného standardu amoxicilinu a ampicilinu probíhalo již během několika minut. Na Obr. č. 61 a 62 je znázorněna změna

koncentrace standardu amoxicilinu přidaného k reálnému vzorku přítoku a odtoku z čistírny odpadních vod. U standardu přidaného k reálnému vzorku přítoku na ČOV probíhala degradace rychleji, po 30 minutách bylo rozloženo 59 % přidaného standardu a po 60 minutách 75 %. Standard přidaný k reálnému vzorku odtoku z ČOV byl po 30 minutách odbourán ze 46 % a po 60 minutách ze 53 %.

Časový rozpad přidaného standardu ampicilinu k reálnému vzorku přítoku na ČOV je znázorněn na Obr. č. 63. Po 30 minutách bylo degradováno 59 % a po 60 minutách 77 % standardu. Standard ampicilinu přidaný k reálnému vzorku odtoku z ČOV degradoval stejně jako standard amoxicilinu pomaleji [Obr. 64]. Po 30 minutách bylo odbouráno 30 % a po 60 minutách 37 %.

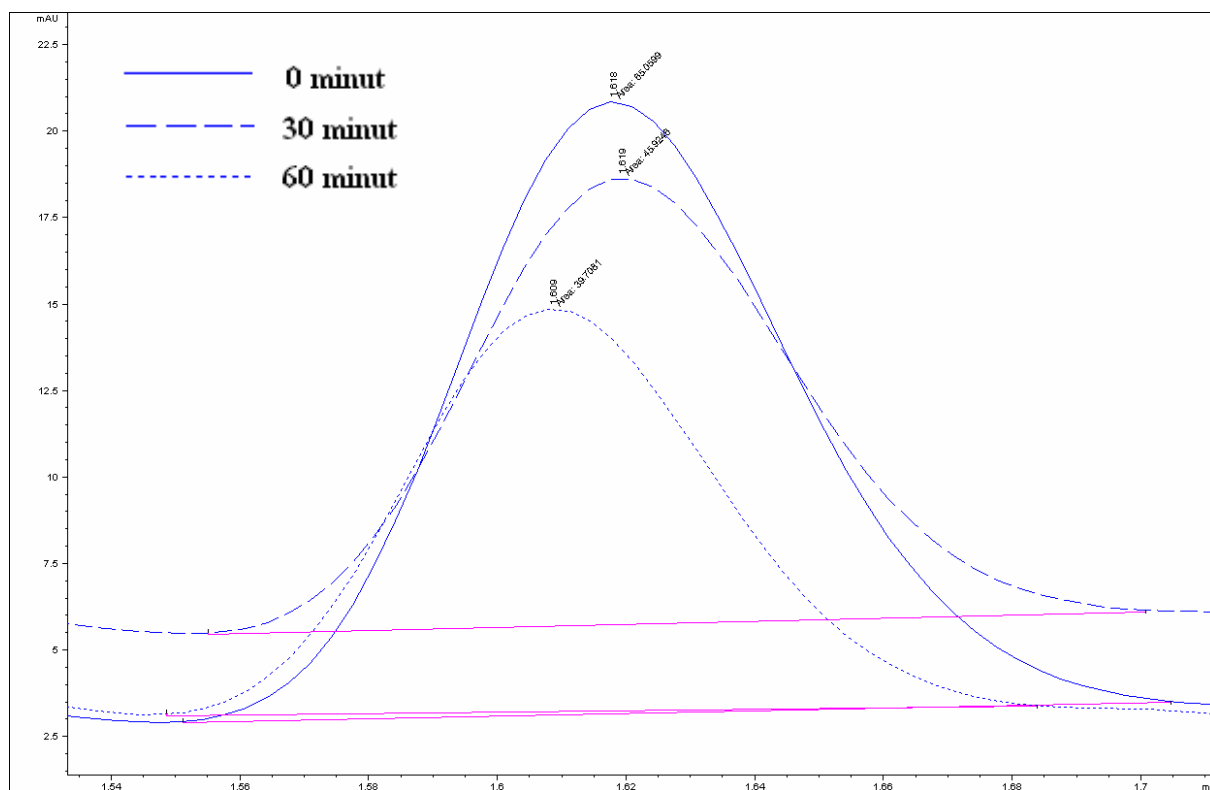
Degradace amoxicilinu a ampicilinu je pravděpodobně způsobena chemickou nestabilitou  $\beta$ -laktamového kruhu, který je velmi citlivý také na pH, teplotu a je hydrolyzován i ionty kovů [33;43].

Standard penicilinu G přidávaný k reálným vzorkům byl v reálném vzorku přítoku i odtoku z ČOV stálý, jak je patrné z Obr. č. 65 a 66.

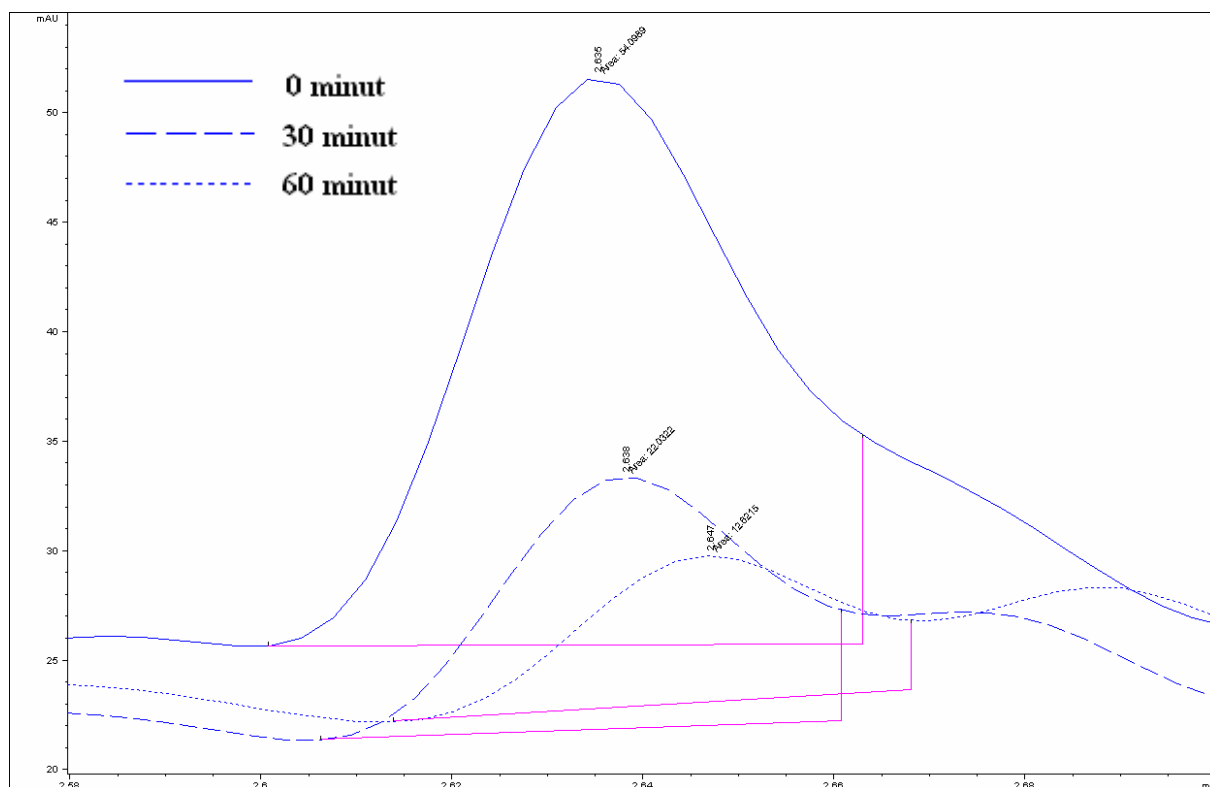


**Obrázek č. 61:** Detail časového rozpadu standardu amoxicilinu přidaného k reálnému vzorku přítoku na ČOV.

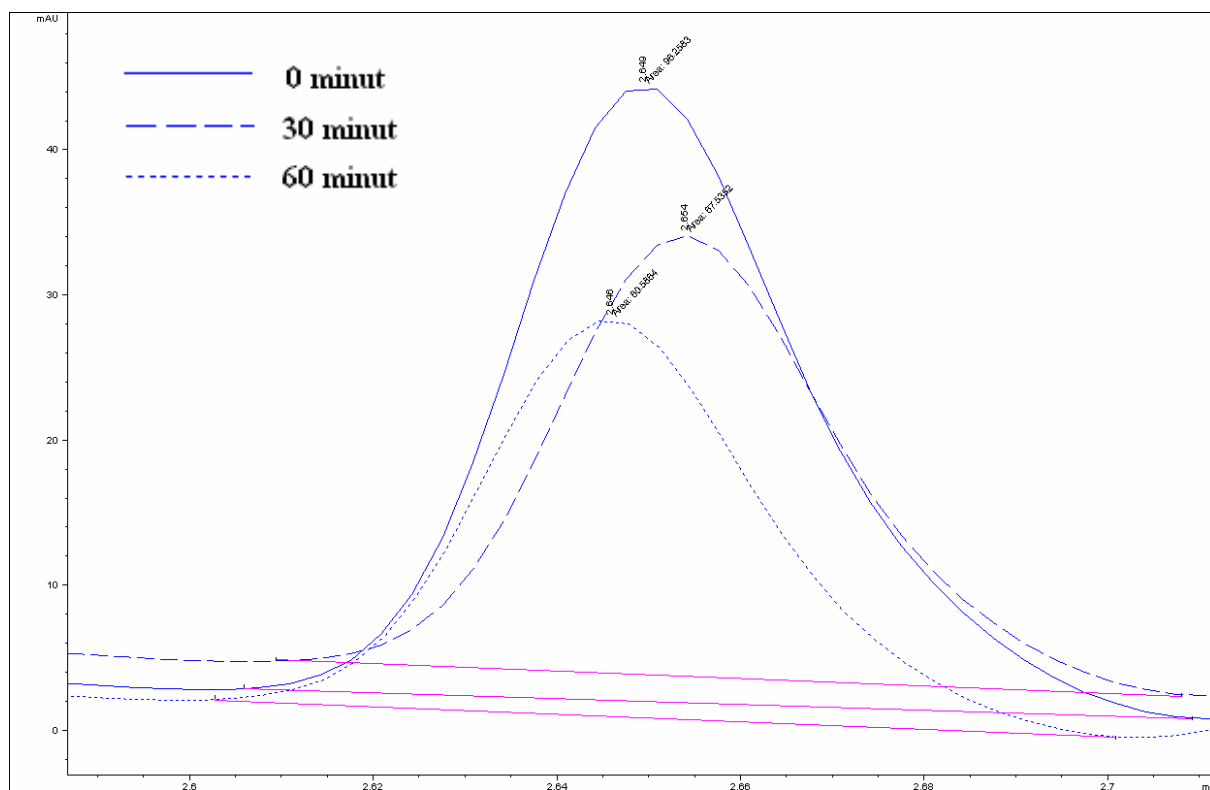




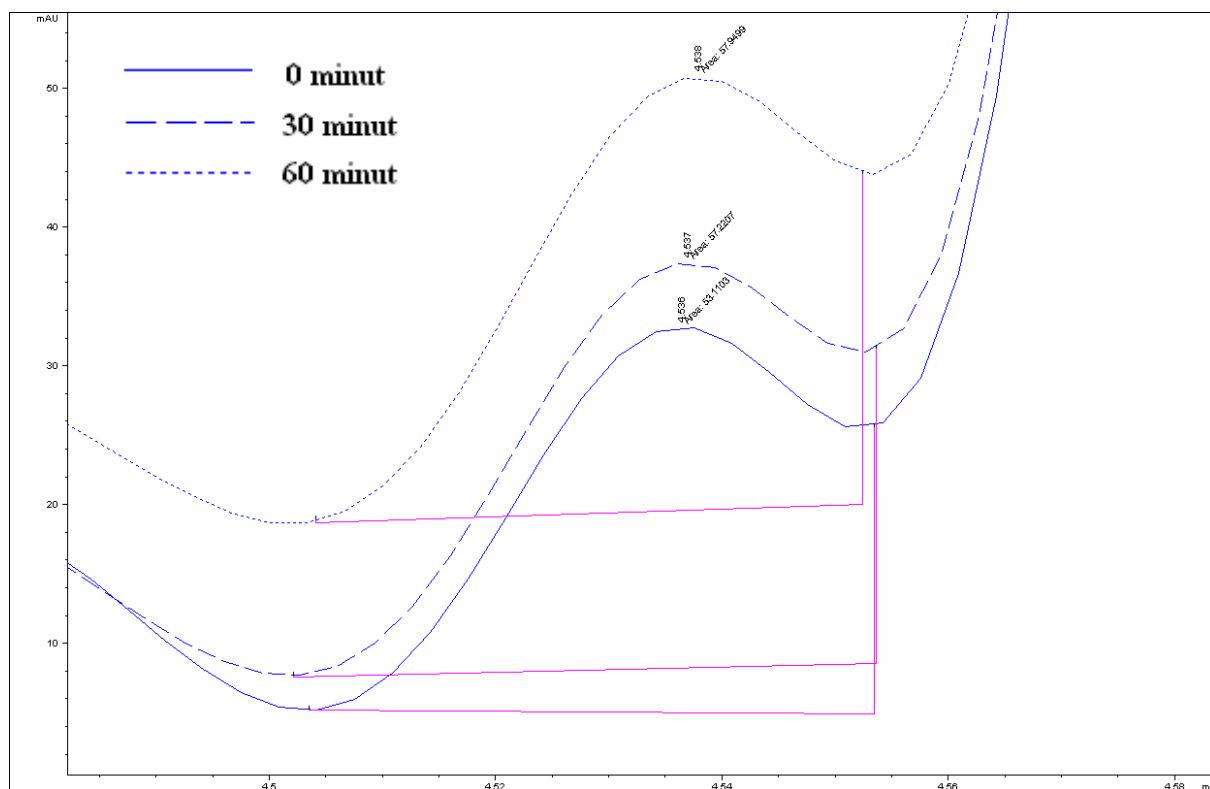
**Obrázek č. 62:** Detail časového rozpadu standardu amoxicilinu přidaného k reálnému vzorku odtoku z ČOV.



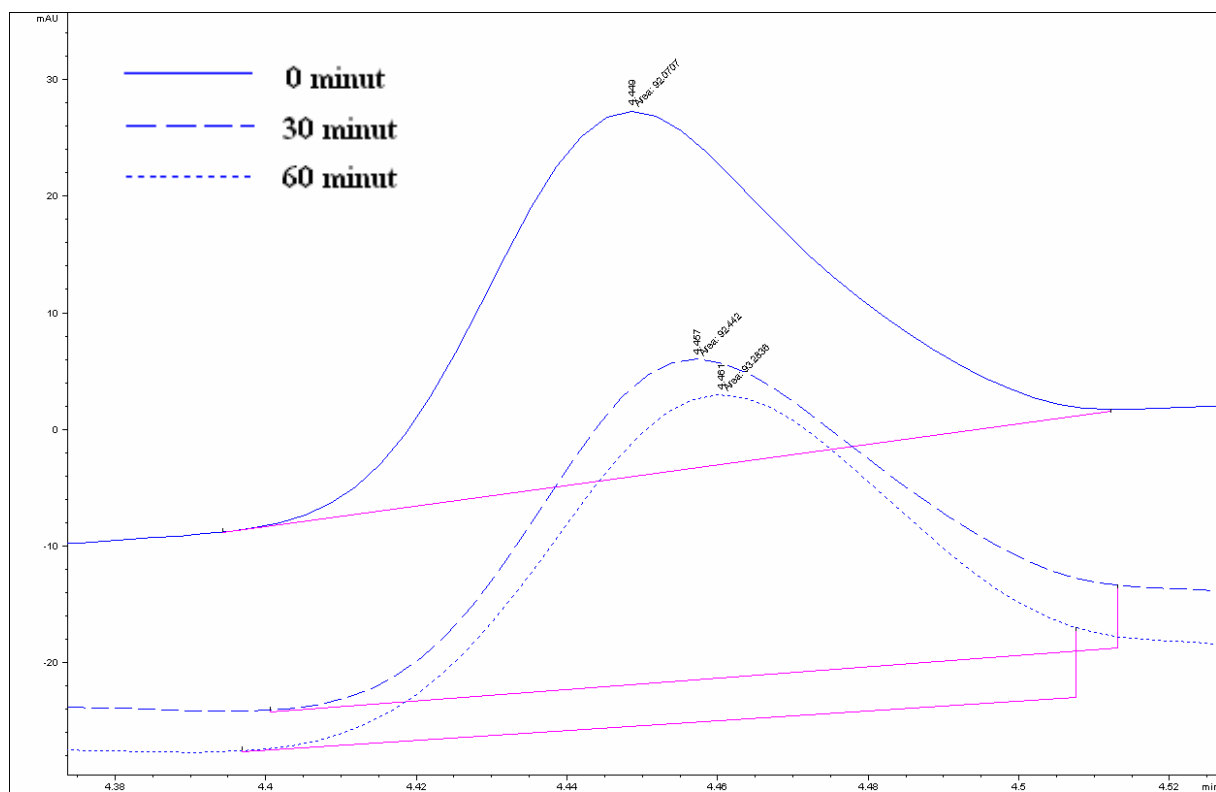
**Obrázek č. 63:** Detail časového rozpadu standardu ampicilinu přidaného k reálnému vzorku přítoku na ČOV.



**Obrázek č. 64:** Detail časového rozpadu standardu ampicilinu přidaného k reálnému vzorku odtoku z ČOV.



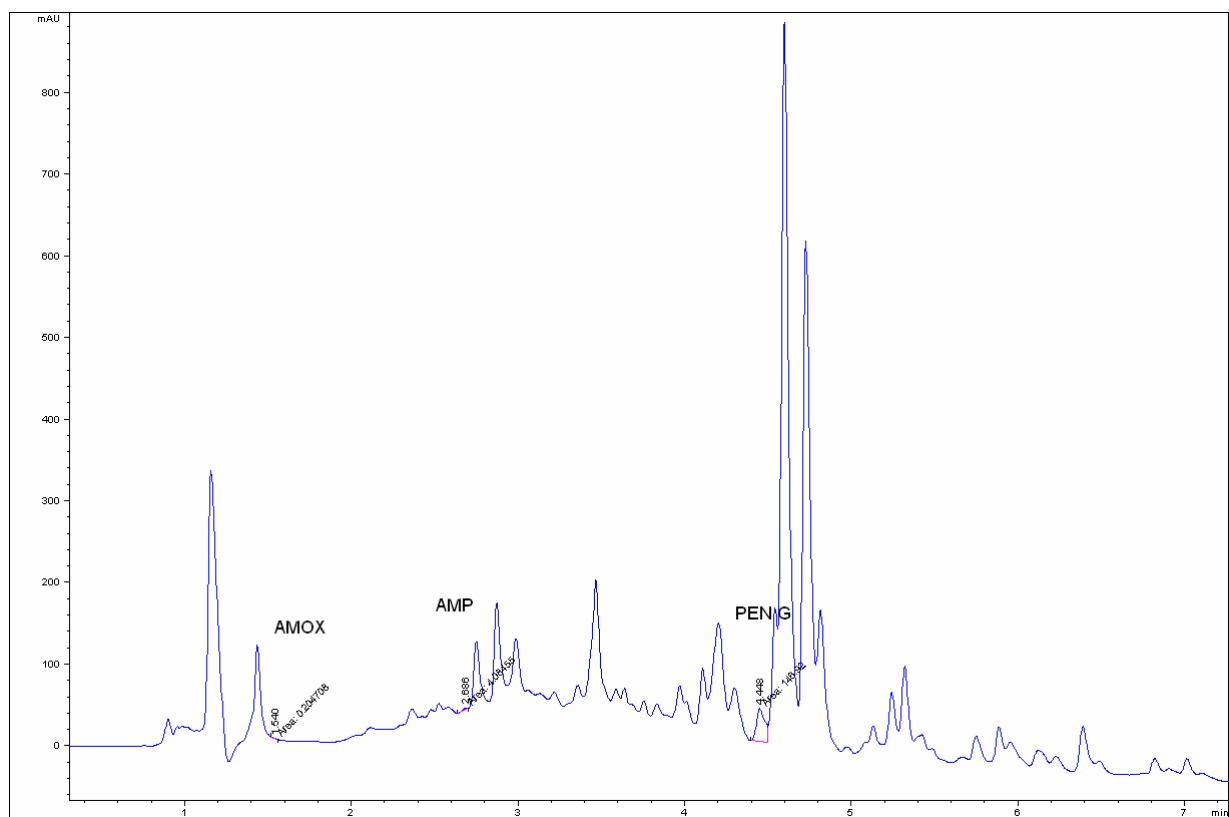
**Obrázek č. 65:** Detail časového rozpadu standardu penicilinu G přidaného k reálnému vzorku přítoku na ČOV.



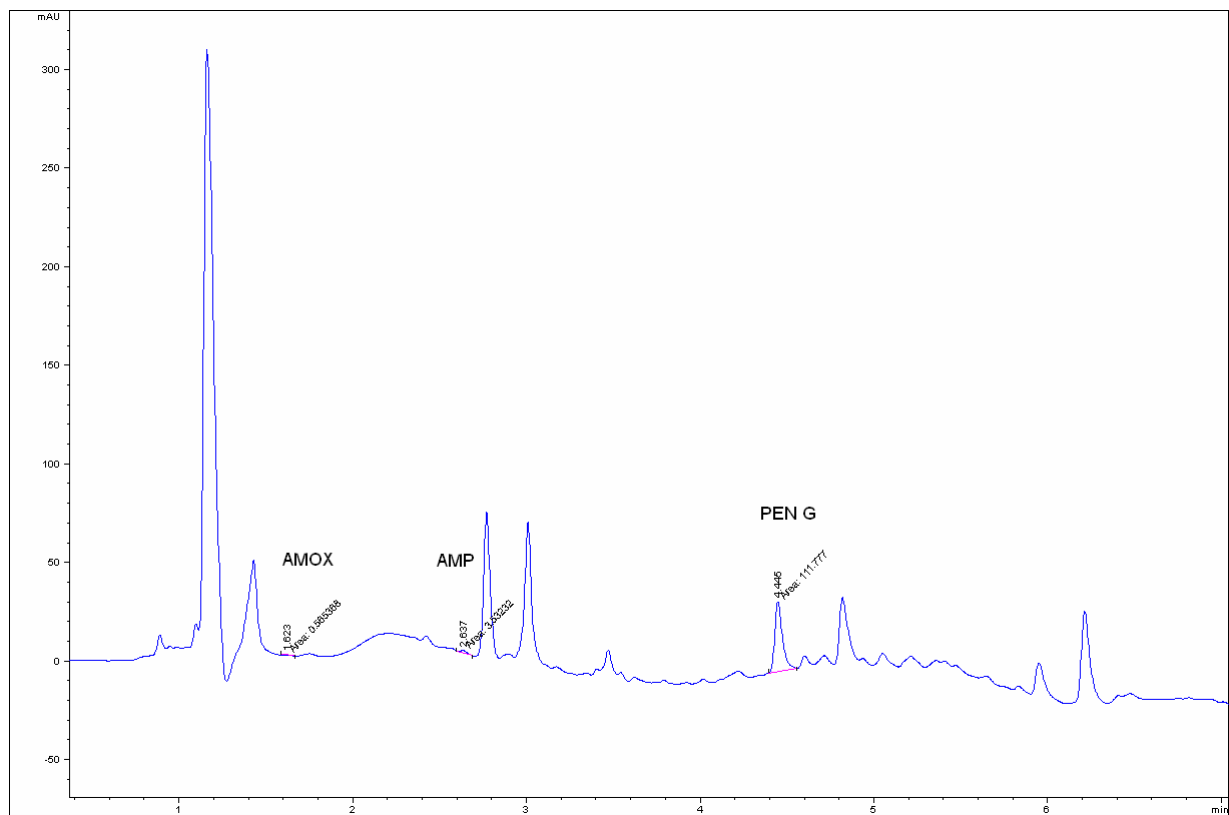
**Obrázek č. 66:** Detail časového rozpadu standardu penicilinu G přidaného k reálnému vzorku odtoku z ČOV.

#### 4.3.1. Reálné vzorky na ČOV VFU Brno

Na základě výše uvedených skutečností, byl v reálných vzorcích stanoven pouze penicilin G. Příklady chromatogramů reálného vzorku z čistírny odpadních vod v areálu Veterinární a farmaceutické univerzity Brno jsou uvedeny na Obr. č. 67 a 68. Stanovené koncentrace na přítoku a na odtoku z ČOV jsou uvedeny v Tab. č. 8. Tabulka obsahuje tři dílčí stanovené koncentrace a jejich průměr. Tyto koncentrace jsou vztaženy na ml elučního činidla, tzn. 300 ml reálného vzorku (viz. kapitola 3.5.2.). V tabulce je také uvedena průměrná koncentrace penicilinu G vztažená na 1 l reálného vzorku.



**Obrázek č. 67:** Chromatogram reálného vzorku – průtok na ČOV VFU.



**Obrázek č. 68:** Chromatogram reálného vzorku – odtok z ČOV VFU.

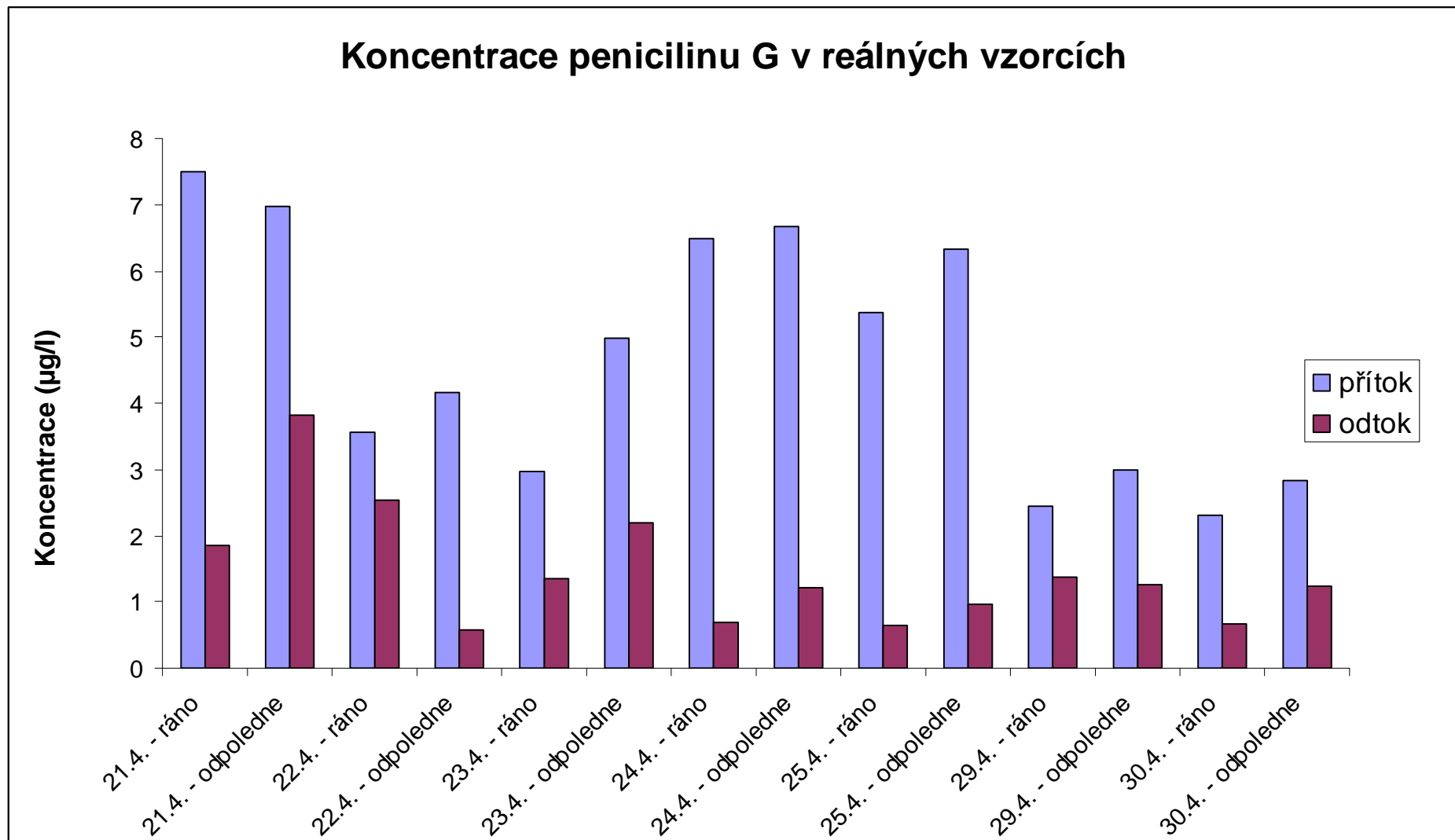
**Tabulka č.8:** Stanovené koncentrace penicilinu G v reálných vzorcích z ČOV VFU Brno.

Datum			c <sub>1</sub> (µg/ml)	c <sub>2</sub> (µg/ml)	c <sub>3</sub> (µg/ml)	c <sub>průměr</sub> (µg/ml)	c <sub>průměr</sub> (µg/l)
21.4.2008	ráno	přítok	0,40	2,73	3,61	2,25	7,49
	ráno	odtok	0,77	0,33	5,55	0,55	1,84
	odpoledne	přítok	1,16	2,62	2,50	2,09	6,98
	odpoledne	odtok	1,32	1,11	1,01	1,14	3,81
22.4.2008	ráno	přítok	1,22	1,10	0,89	1,07	3,56
	ráno	odtok	0,93	0,63	0,72	0,76	2,54
	odpoledne	přítok	1,06	1,15	1,53	1,25	4,16
	odpoledne	odtok	0,17	0,18	0,17	0,17	0,58
23.4.2008	ráno	přítok	0,85	0,96	0,87	0,89	2,98
	ráno	odtok	0,35	0,56	0,32	0,41	1,36
	odpoledne	přítok	1,40	1,68	1,41	1,50	4,99
	odpoledne	odtok	0,76	0,62	0,59	0,66	2,20
24.4.2008	ráno	přítok	1,63	2,07	2,13	1,94	6,48
	ráno	odtok	0,24	0,20	0,17	0,20	6,77
	odpoledne	přítok	2,19	1,70	2,11	2,00	6,67
	odpoledne	odtok	0,19	0,17	0,72	0,36	1,20
25.4.2008	ráno	přítok	1,74	1,67	1,43	1,61	5,38
	ráno	odtok	0,23	0,17	0,18	0,20	0,65
	odpoledne	přítok	1,98	1,49	2,23	1,90	6,33
	odpoledne	odtok	0,28	0,36	0,23	0,29	0,97
29.4.2008	ráno	přítok	0,70	0,88	0,62	0,73	2,44
	ráno	odtok	0,50	0,25	0,49	0,41	1,37
	odpoledne	přítok	0,83	0,81	0,11	0,90	3,00
	odpoledne	odtok	0,43	0,40	0,31	0,38	1,26
30.4.2008	ráno	přítok	0,90	0,53	0,66	0,69	2,31
	ráno	odtok	0,20	0,23	0,17	0,20	0,66
	odpoledne	přítok	0,85	0,79	0,91	0,85	2,84
	odpoledne	odtok	0,20	0,49	0,43	0,37	1,24

Koncentrace penicilinu G na přítoku na ČOV se pohybovaly v rozmezí hodnot 7,49 až 2,31 µg/l. Průměrná koncentrace činila 4,69 µg/l. Směrodatná odchylka dosáhla hodnoty 1,79 µg/l. Velikost směrodatné odchylky je způsobena skoky v koncentracích [Obr. 69].

Koncentrace penicilinu G na odtoku z ČOV se pohybovaly mezi 3,81 a 0,58 µg/l. Průměrná hodnota koncentrace na odtoku z ČOV činila 1,45 µg/l. Směrodatná odchylka dosáhla hodnoty 0,86 µg/l. Hodnota této směrodatné odchylky je také výrazně ovlivněna skoky koncentrací na odtoku z ČOV [Obr. 69].

Z výsledků, které shrnuje Tab. č. 8 a Obr. č. 69, jsou patrné výrazné změny koncentrace penicilinu G během sledovaného období. Kolísání hodnot může být způsobeno rozdílným množstvím, které bylo jednotlivé dny aplikováno v rámci léčby. Hodnoty koncentrací na přítoku v odpoledních hodinách byly v porovnání s ranními hodnotami vyšší, což by mohlo být způsobeno odpoledním úklidem klinik. Výjimku tvoří pouze pondělí 21.4.2008. Zde mohlo dojít k ovlivnění koncentrace penicilinu G úklidem po víkendu, kdy je provoz na klinikách omezen pouze na pohotovost a úklid nemusí být prováděn v takovém rozsahu jako za běžného provozu. V ranních hodinách se proto v odpadní vodě mohlo vyskytovat vyšší množství penicilinu G z předchozích dní.



**Obrázek č. 69:** Změna koncentrace penicilinu G v reálných vzorcích z ČOV VFU Brno.

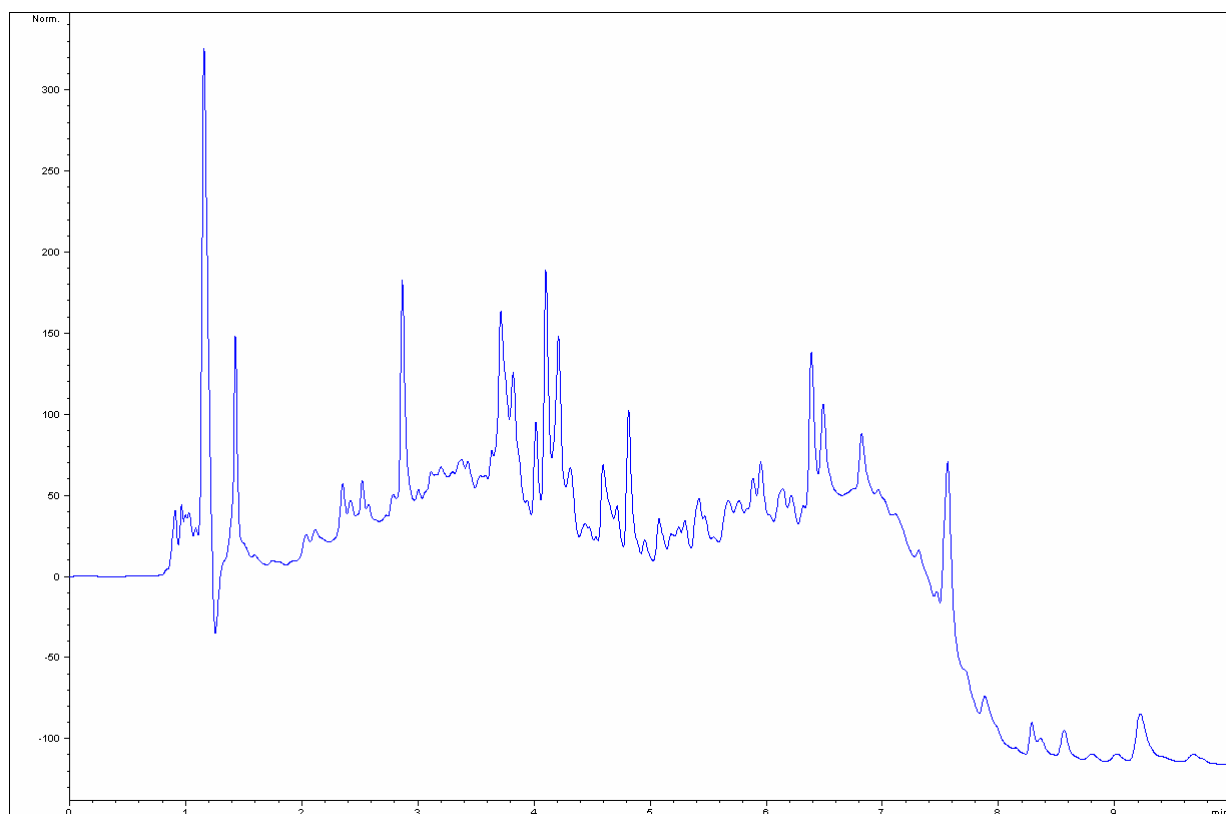
**Tabulka č.9:** Průměrné koncentrace a odstraněné množství penicilinu G v reálných vzorcích z ČOV VFU Brno.

Datum	Hodina	Přítok (µg/l)	Odtok (µg/l)	Odstraněno (µg/l)	Odstraněno (%)
21.4.2008	ráno	7,49	1,84	5,65	75,4
21.4.2008	odpoledne	6,98	3,81	3,17	45,4
22.4.2008	ráno	3,56	2,54	1,02	28,7
22.4.2008	odpoledne	4,16	0,58	3,58	86,1
23.4.2008	ráno	2,98	1,36	1,62	54,5
23.4.2008	odpoledne	4,99	2,20	2,79	56,0
24.4.2008	ráno	6,48	0,68	5,80	89,6
24.4.2008	odpoledne	6,67	1,20	5,46	81,9
25.4.2008	ráno	5,38	0,65	4,73	87,9
25.4.2008	odpoledne	6,33	0,97	5,36	84,7
29.4.2008	ráno	2,44	1,37	1,06	43,7
29.4.2008	odpoledne	3,00	1,26	1,74	58,0
30.4.2008	ráno	2,31	0,66	1,64	71,3
30.4.2008	odpoledne	2,84	1,24	1,60	56,2

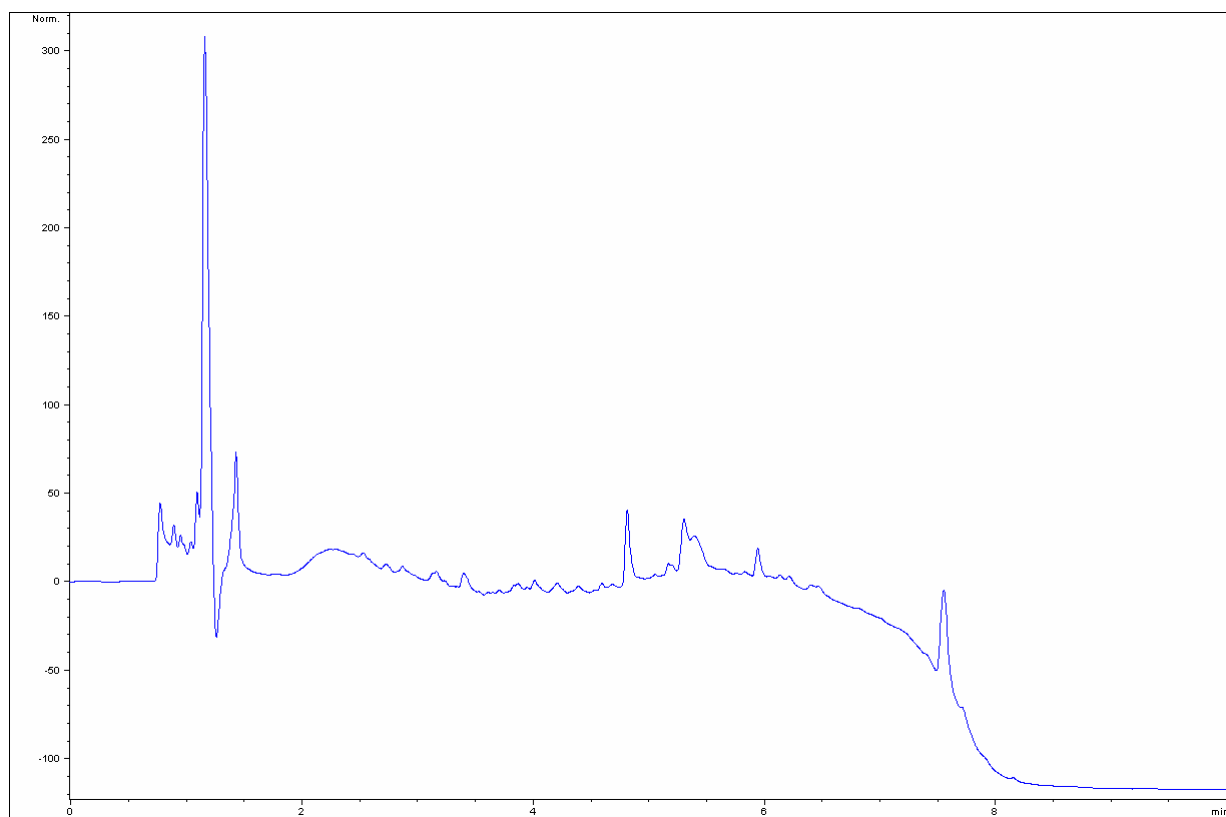
Průměrná koncentrace na přítoku na ČOV činila 4,69 µg/l a na odtoku 1,45 µg/l. Na ČOV bylo tedy průměrně odstraněno 3,24 µg/l, což odpovídá 69 %. Odstraněné množství se pohybovalo v rozmezí 45,4 až 89,6 %. Tyto výsledky potvrzují poznatky získané z literatury, kde se uvádí, že antibiotika nejsou na ČOV zcela odstraněna.

#### 4.3.2. Reálné vzorky na ČOV Brno-Modřice

Reálné vzorky přítoku a odtoku z městské velkokapacitní čistírny odpadních vod Brno-Modřice byly odebrány 29.4.2008. Penicilin G nebyl na přítoku ani odtoku z ČOV detekován. Chromatogramy přítoku i odtoku jsou uvedeny na Obr. č. 70 a 71.



**Obrázek č. 70:** Chromatogram reálného vzorku – průtok na ČOV Brno-Modřice.



**Obrázek č. 71:** Chromatogram reálného vzorku – odtok z ČOV Brno-Modřice.



## 5. ZÁVĚR

Tématem této diplomové práce bylo využití separačních metod pro stanovení vybraných léčiv ve vodách. Sledovanými léčivy byly amoxicilin, ampicilin a penicilin G (benzylpenicilin) patřící do skupiny penicilinových antibiotik. Tato antibiotika byla vybrána, z důvodu časté aplikace v humánní i veterinární medicíně.

Mezi separační metody používané pro stanovení léčiv patří kapalinová chromatografie, plynová chromatografie a kapilární elektromigrační metody. Na základě poznatků získaných při zpracování literární rešerše byla jako vhodná separační metoda pro stanovení výše uvedených antibiotik vybrána vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).

Vzorky byly odebírány z čistírny odpadních vod v areálu Veterinární a farmaceutické univerzity Brno. Toto odběrové místo bylo zvoleno proto, že zde byl předpokládán zvýšený výskyt uvedených antibiotik. Dále byly vzorky odebrány z velkokapacitní čistírny odpadních vod v Brně-Modřicích.

Byla vypracována vhodná technika pro izolaci reziduí uvedených léčiv a analytický postup pro jejich identifikaci a stanovení. Vlastní identifikace a stanovení bylo provedeno vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s UV-VIS detektorem typu DAD (HPLC/DAD).

Izolace amoxicilinu, ampicilinu a penicilinu G byla provedena extrakcí pevnou fází (SPE). Tato metoda byla ověřena stanovením výtěžností, jejichž průměrné hodnoty činily pro amoxicilin 91,4 %, pro ampicilin 94,7 % a pro penicilin G 91,7 %. Pro metodu byly určeny meze detekce a stanovitelnosti všech sledovaných látek.

Z důvodu velmi nízkých koncentrací sledovaných analytů v reálných vzorcích, byly vzorky vyhodnoceny metodou standardního přídatku. Analýzou reálných vzorků s přídatkem standardu bylo zjištěno, že amoxicilin a ampicilin jsou v reálném vzorku velmi nestabilní. Na základě této skutečnosti byl v reálných vzorcích stanoven pouze penicilin G.

Skutečnost, že amoxicilin a ampicilin jsou v reálném vzorku nestabilní naznačuje, že se jedná o látky málo perzistentní v životním prostředí. Toto potvrzují i poznatky získané z literatury, kde se uvádí, že  $\beta$ -laktamová antibiotika snadno podléhají hydrolyze nestabilního  $\beta$ -laktamového kruhu. Penicilin G, přestože obsahuje také nestabilní  $\beta$ -laktamový kruh, byl detekován na přítoku i odtoku ČOV VFU Brno. Průměrná koncentrace penicilinu G na přítoku dosáhla hodnoty 4,69  $\mu\text{g/l}$  a na odtoku 1,45  $\mu\text{g/l}$ . Průměrné odstraněné množství činilo 3,24  $\mu\text{g/l}$ , což odpovídá 69 %. Výskyt penicilinu G v těchto odpadních vodách může být způsoben používáním na klinikách VFU. Ve vzorcích z ČOV Brno-Modřice rezidua tohoto léčiva detekována nebyla.

## 6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] SIMON, C., STILLE, W.: *Antibiotika v současné lékařské praxi*. 1. vyd. české Praha : Grada Publishing, 1998. 711 s. ISBN 80-7169-268-9.
- [2] HAMPL, F., PALEČEK, J.: *Farmakochemie*. 1. vyd. Praha : VŠCHT Praha, 2002. 413 s. ISBN 80-7080-495-5.
- [3] HYNIE, S.: *Speciální farmakologie : Protiinfekční léčba*. 2. přeprac. vyd. Praha : Karolinum, 2003. 239 s. ISBN 80-246-0657-7.
- [4] HEJZLAR, M.: *Antibiotika v praxi*. 2. přeprac. vyd. Praha : Markopulos, 1995. 499 s. ISBN 80-901776-4-6.
- [5] PŘÍBORSKÝ, J.: *Peniciliny : Farmakologie a klinická farmakologie*. 1. vyd. Praha : Maxdorf, Nakladatelství odborné literatury, 2004. 105 s. ISBN 80-7345-026-7.
- [6] HAVLÍK, J.: Současné možnosti "starších" antibiotik v terapeutické praxi. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2003, roč. 17, č. 3, s. 183-185.
- [7] LOCHMANN, O.: *Základy antimikrobní terapie*. 1. vyd. Praha : Triton, 1994. 175 s. ISBN 80-85875-05-5.
- [8] LOCHMANN, O.: *Antimikrobní terapie v praxi*. 1. vyd. Praha : Triton, 2006. 204 s. ISBN 80-7254-826-3.
- [9] KOLÁŘ, M., URBÁNEK, K., LOCHMANNOVÁ, J., jr.: Výchozí zdroje racionální antibiotické léčby bakteriálních infekcí. *Praktické lékařství*. 2006, roč. 2, č. 1, s. 20-23.
- [10] LÜLLMANN, H., MOHR, K., HEIN, L.: *Barevný atlas farmakologie*. 3. vyd. Praha : Grada Publishing, 2007. 384 s. ISBN 978-80-247-1672-5.
- [11] MARTÍNKOVÁ, J., et al. *Farmakologie : Pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, 2007. 380 s. ISBN 978-80-247-1356-4.
- [12] WENKE, M., et al. *Farmakologie : Učebnice pro lékařské fakulty*. 1. vyd. Praha : AVICENUM, zdravotnické nakladatelství, n.p., 1986. 580 s. ISBN 08-027-86.
- [13] LINCOVÁ, D., FARGHALI, H.: *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. dopl. vyd. Praha : Galén, 2007. 672 s. ISBN 978-80-7262-373-0.
- [14] ŠČIGEL, V.: *Antibiotika v praxi zubního lékaře*. 1. vyd. Praha : Quintessenz, 2005. 224 s. ISBN 80-903181-9-3.
- [15] DOSTÁLEK, M., a kol.: *Farmakokinetika*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, 2006. 220 s. ISBN 80-247-1464-7.

- [16] LÜLLMANN, H., MOHR, K., WEHLING, M.: *Farmakologie a toxikologie*. 2. vyd. Praha : Grada Publishing, 2004. 728 s. ISBN 80-247-0836-1.
- [17] TISOŇOVÁ, J., KRIŠKA, M., a kol.: *Základy farmakologie : pre nelekárské študijné odbory*. 1. vyd. Bratislava : Vydavateľstvo UK, 2007. 292 s. ISBN 978-80-223-2279-9.
- [18] HERA, A., NEPEJCHALOVÁ, L., ŠIMŮNEK, J.: *Obecná farmakologie : pro studenty veterinárního lékařství*. 1. vyd. Brno : Ediční středisko VFU, 2005. 101 s. ISBN 80-7305-528-7.
- [19] KATZUNG, B. G.: *Základní a klinická farmakologie*. 2. vyd. české Praha: Nakladatelství H&H Vyšehradská, 2006. 1106 s. ISBN 80-7319-056-7.
- [20] KVĚTINA, J., HERINK, J., VOPRŠALOVÁ, M.: *Farmakologie pro farmaceuty 1.díl: Obecná farmakologie*. 1. vyd. Brno : Veterinární a farmaceutická universita Brno, 2003. 109 s. ISBN 80-7305-457-4.
- [21] JØRGENSEN, S. E. , HALLING-SØRENSEN , B.: Drugs in the environment. *Chemosphere*. 2000, vol. 40, is. 7, s. 691-699.
- [22] HEBERER, T.: Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment : a review of recent research data. *Toxicology Letters*. 2002, vol. 131, is. 1-2, s. 5-17.
- [23] HIRSH, R., et al. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*. 1999, vol. 225, is. 1-2, s. 109-118.
- [24] KOLÁŘ, M., URBÁNEK, K., ČEKANOVÁ, L.: Podklady pro racionální antibiotickou léčbu komunitních bakteriálních infekcí. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2003, roč. 17, č. 1, s. 22-24.
- [25] KARTHIKEYAN, K.G., MEYER, M. T.: Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. *Science of the Total Environment*. 2006, vol. 361, is. 1-3, s. 196-207.
- [26] TERNES, T. A.: Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*. 1998, vol. 32, is. 11, s. 3245-3260.
- [27] HALLING-SØRENSEN, B., et al.: Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment : A Review. *Chemosphere*. 1998, vol. 36, is. 2, s. 357-393.
- [28] *Možnosti náhrady antibiotických stimulátorů růstu ve výživě zvířat* [online]. 2003 [cit. 2007-11-12]. Dostupný z WWW: <<http://www.vuzv.cz/vyziva/studie01.htm>>.
- [29] KAY, P., BLACKWELL, P. A., BOXALL, A. B.A.: Transport of veterinary antibiotics in overland flow following the application of slurry to arable land. *Chemosphere*. 2005, vol. 59, is. 7, s. 951-959.

- [30] VYDROVÁ, L.: *Stanovení reziduí a degradačních produktů tetracyklinu a chlortetracyklinu v odpadních vodách*. Brno, 2007. 68 s. VUT, FCH, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí. Diplomová práce.
- [31] BEAUSSE, J.: Selected drugs in solid matrices : a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *Trends in Analytical Chemistry*. 2004, vol. 23, is. 10-11, s. 753-671.
- [32] VÍTEČKOVÁ, H.: *Stanovení reziduí léčiv v odpadních vodách metodou HPLC*. Brno, 2006. 56 s. VUT, FCH, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí. Diplomová práce.
- [33] LI, D., et al.: Determination of penicillin G and its degradation products in a penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river. *Water Research*. 2007, v tisku.
- [34] YANG, S., CARLSON, K.: Evolution of antibiotic occurrence in a river through pristine, urban and agricultural landscapes. *Water Research*. 2003, vol. 37, is. 19, s. 4645-4656.
- [35] *Český lékopis 2005*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, 2005. 3 sv. (880, 1156, 1228 s.). ISBN 80-247-1532-5.
- [36] *Antibiotika* [online]. [cit. 2007-11-27]. Dostupný z WWW: <[camelot.lfhk.cuni.cz/farmakol/cz/antib99.doc](http://camelot.lfhk.cuni.cz/farmakol/cz/antib99.doc)>.
- [37] JOSS, A., et al.: Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment : Proposing a classification scheme. *Water Research*. 2006, vol. 40, is. 8, s. 1686-1696.
- [38] MALÝ, J., HLAVÍNEK, P.: *Čištění průmyslových odpadních vod*. 1. vyd. Brno : Noel 2000, 1996. 255 s. ISBN 80-86020-05-3.
- [39] CHUDOBA, J., DOHÁNYOS, M., WANNER, J.: *Biologické čištění odpadních vod*. 1. vyd. Praha : SNTL, Nakladatelství technické literatury, 1991. 468 s. ISBN 80-03-00611-2.
- [40] JOSS, A., et al.: Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Water Research*. 2005, vol. 39, is. 14, s. 3139-3152.
- [41] CARBALLA, M., et al.: Influence of ozone pre-treatment on sludge anaerobic digestion: Removal of pharmaceutical and personal care products. *Chemosphere*. 2007, vol. 67, is. 7, s. 1444-1452.
- [42] SPÍŽEK, J.: Rezistence na antibiotika : Je třeba hledat nové látky a nové postupy. *Vesmír*. 1999, roč. 27, č. 1

- [43] CHA, J.M., YANG, S, CARLSON, K.H.: Trace antibiotics in surface water and urban wastewater using liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. determination of  $\beta$ -lactam 2006, vol. 1115, is. 1-2, s. 46-57.
- [44] POVÝŠILOVÁ, M.: Odběry vzorků z čistíren odpadních vod. In *Odběry vzorků, sborník přednášek z kurzu*. 2. upr. vyd. Český Těšín : 2THETA, 2006. s. 265-267. ISBN 80-86380-33-5.
- [45] ČURDOVÁ, E., KOPLÍK, R., MESTELEK, O.: Zásady správného vzorkování. In *Odběry vzorků v terénu, sborník přednášek z kurzu*. 1. vyd. Český Těšín : 2THETA, 1999. s. 16-26. ISBN 80-902432-8-2.
- [46] BRUNO, F., et al.: Method development for measuring trace levels of penicillins in aqueous environmental samples . *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2001, vol. 15, is. 16, s. 1391-1400.
- [47] LINDBERG, R., et al.: Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards . *Chemosphere*. 2004, vol. 57, is. 10, s. 1479-1488.
- [48] BABIĆ, S., et al.: Solid phase extraction and HPLC determination of veterinary pharmaceuticals in wastewater. *Talanta*. 2006, vol. 70, is. 4, s. 732-738.
- [49] CAHILL, J. D, et al.: Determination of pharmaceutical compounds in surface- and ground-water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry . *Journal of Chromatography A*. 2004, vol. 1041, is. 1-2, s. 171-180.
- [50] HIRSCH, R., et al.: Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1998, vol. 815, is. 2, s. 213-223.
- [51] BENITO-PEÑA, E., et al.: Evaluation of mixed mode solid phase extraction cartridges for the preconcentration of beta-lactam antibiotics in wastewater using liquid chromatography with UV-DAD detection. *Analytica chimica acta*. 2006, vol. 556, is. 2, s. 415-422.
- [52] SACHER, F., et al.: Pharmaceuticals in groundwaters Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany . *Journal of Chromatography A*. 2001, vol. 938, is. 1-2, s. 199-210.
- [53] PROCHÁZKOVÁ, D.: Extrakce tuhou fází (SPE) a mikroextrakce tuhou fází (SPME), extrakční metody pro přípravu vzorku k analýze. In *Analýza organických látek, sborník přednášek z kurzu*. 2. upr. vyd. Český Těšín : 2THETA, 2005. s. 25-56. ISBN 80-86380-29-7.
- [54] *Extrakce na tuhou fázi* [online]. [cit. 2007-12-05]. Dostupný z WWW: <<http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/13080/01.pdf>>.

- [55] JANKŮ, J., ČERMÁK, J. jr.: *Vzorkování odpadů : Učební texty* [online]. Praha : [cit. 2007-12-05]. Dostupný z WWW: <[http://www.vscht.cz/uchop/udalosti/skripta/vzorkovani/Vzorkovani\\_070104\\_4.pdf](http://www.vscht.cz/uchop/udalosti/skripta/vzorkovani/Vzorkovani_070104_4.pdf)>.
- [56] POPL, M., FÄHNRIK, J.: *Analytická chemie životního prostředí*. 4. přeprac. vyd. Praha : Vydavatelství VŠCHT, 1999. 218 s. ISBN 80-7080-336-3.
- [57] *Extrakce* [online]. [cit. 2007-12-07]. Dostupný z WWW: <[natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf](http://natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf)>.
- [58] *Extrakce na tuhou fázi* [online]. 2000 [cit. 2007-12-07]. Dostupný z WWW: <<http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>>.
- [59] TERNES, T. A.: Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples . *Trends in Analytical Chemistry*. 2001, vol. 20, is. 8, s. 419-434.
- [60] AHRER, W., SCHERWENK, E., BUCHBERGER, W.: Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2001, vol. 910, is. 1, s. 69-78.
- [61] ŠTULÍK, K., et al.: *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha : Karolinum, 2005. 264 s. ISBN 80-246-0852-9.
- [62] PERTILE, E., ČABLÍK, V.: *Instrumentální metody analýzy*. 1. vyd. Ostrava : VŠB, Technická univerzita Ostrava, 2006. 238 s. ISBN 80-248-1049-2.
- [63] JANDERA, P.: Pokroky v technice vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro analýzu organických látek. In *Analýza organických látek, sborník přednášek z kurzu*. 2. upr. vyd. Český Těšín : 2THETA, 2005. s. 209-236. ISBN 80-86380-29-7.
- [64] POSPÍŠIL, M. *Instrumentální metody výzkumu a analýzy I*. 2. vyd. Praha : Vydavatelství ČVUT, 2004. 141 s. ISBN 80-01-02922-0.
- [65] *Český lékopis 2002*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, 2002. 5 sv. (1136, 1264, 1320, 1336, 700 s.). ISBN 80-247-0464-1.
- [66] KARLÍČEK, R., et al.: *Analytická chemie pro farmaceuty*. 2. vyd. Praha : Karolinum, 2001. 281 s. ISBN 80-246-0348-9.
- [67] VŘEŠŤÁL, J., et al. *Hmotnostní spektrometrie*. 2. dopl. vyd. Brno : Masarykova univerzita v Brně, 2000. 114 s. ISBN 80-210-283-3.
- [68] *Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS)* [online]. [cit. 2007-12-09]. Dostupný z WWW: <<http://www.bris.ac.uk/nerclsmf/techniques/gcms.html>>.
- [69] *Hmotnostní spektroskopie: Principy, zařízení, využití* [online]. 2000 [cit. 2007-12-09]. Dostupný z WWW: <<http://faf.vfu.cz/fytochem/Hmotnostn%C3%AD%20spektroskopie.pdf>>.

- [70] *HPLC* [online]. [cit. 2008-03-01]. Dostupný z WWW: <<http://www.hplc.cz/>>.
- [71] KAI, M., et al.: Sensitive determination of a  $\beta$ -lactam antibiotic, cefaclor by liquid chromatography with chemiluminescence detection . *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2003, vol. 30, is. 6, s. 1765-1771.
- [72] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. upr. vyd. Ostrava : Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [73] JANČÁŘOVÁ, I., JANČÁŘ, L. *Analytická chemie*. 1. vyd. Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2003. 195 s. ISBN 80-7157-647-6.
- [74] VOLKA, K., et al. *Analytická chemie II*. 1. vyd. Praha : VŠCHT, 1995. 236 s. ISBN 80-7080-227-8.
- [75] ŠEVČÍK, J.G.K. Plynová chromatografie. In *Analýza organických látek, sborník přednášek z kurzu*. 2. upr. vyd. Český Těšín : 2 THETA, 2005. s. 103-150. ISBN 80-86380-29-7.
- [76] TEKEĽ, J., MIKUŠ, P. *Vybrané kapitoly z analytickej chémie : Analýza látok v biologických systémoch*. 1. vyd. Bratislava : UK, 2005. 196 s. ISBN 80-223-1988-0.
- [77] GLATZ, Z. Micelární elektrokinetická chromatografie. In *Elektroanalytické metody, sborník přednášek z kurzu*. 1. vyd. Český Těšín : 2 THETA, 2001. s. 296-306. ISBN 80-86380-07-6.
- [78] PREU, M., GUYOT, D., PETZ, M. Development of a gas chromatography–mass spectrometry method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using experimental design for the optimisation of the derivatisation reactions. *Journal of Chromatography A*. 1998, vol. 818, is. 1, s. 95-108.
- [79] CHIAVARINO, B., et al. Determination of sulfonamide antibiotics by gas chromatography coupled with atomic emission detection. *Journal of Chromatography B*. 1998, vol. 706, is. 2, s. 269-277.
- [80] ALTRIA, K.D., KELLY, M.A., CLARK, B.J. Current applications in the analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis. II. *Trends in analytical chemistry*. 1998, vol. 17, no. 7, s. 214-226.
- [81] PAJCHEL, G., PAWLOWSKI, K., TYSKI, S. CE versus LC for simultaneous determination of amoxicillin/clavulanic acid and ampicillin/sulbactam in pharmaceutical formulations for injections. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2002, vol. 29, is. 1-2, s. 75-81.
- [82] MRESTANI, Y., et al. Application of capillary zone electrophoresis in cephalosporin analysis. *Journal of Chromatography B*. 1997, vol. 690, is. 1-2, s. 321-326.

- [83] GÁSPÁR, A., ANDRÁSI, M., KARDOS, S. Application of capillary zone electrophoresis to the analysis and to a stability study of cephalosporins. *Journal of Chromatography B*. 2002, vol. 775, is. 2, s. 239-246.
- [84] PARKER, C.E., et al. Application of nanoscale packed capillary liquid chromatography (75  $\mu\text{m}$  id) and capillary zone electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry to the analysis of macrolide antibiotics. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 1992, vol. 3, is. 5, s. 563-574.
- [85] CECILIA, M., et al. Simultaneous determination of tetracyclines in pharmaceuticals by CZE using experimental design. *Talanta*. 2006, vol. 70, is. 2, s. 236-43.
- [86] YONGXIN, Z., et al. Analysis of benzylpenicillin by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 1997, vol. 792, is. 1-2, s. 83-88.
- [87] PAJCHEL, G., MICHALSKA, K., TYSKI, S. Analysis of phenoxymethylpenicillin potassium by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2005, vol. 1087, is. 1-2, s. 197-202.
- [88] PAJCHEL, G, MICHALSKA, K, TYSKI, S. Application of capillary electrophoresis to the determination of various benzylpenicillin salts. *Journal of Chromatography A*. 2004, vol. 1032, is. 1-2, s. 265-272.
- [89] *Separační metody v analytické chemii* [online]. [cit. 2008-02-27]. Dostupný z WWW: <[http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/analyticka\\_chemie/separa.htm](http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separa.htm)>.
- [90] *Schéma GC* [online]. [cit. 2008-02-27]. Dostupný z WWW: <<http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:SchemaGC.png>>.
- [91] *Flame Ionization Detector* [online]. [cit. 2008-02-27]. Dostupný z WWW: <<http://acpcommunity.acp.edu/Facultystaff/hass/oc1/exp/nabh4/nabh4des.html>>.
- [92] *Capillary electrophoresis* [online]. [cit. 2008-02-27]. Dostupný z WWW: <<http://www.answers.com/topic/capillary-electrophoresis?cat=technology>>.
- [93] Agilent Technologies - ZORBAX Eclipse XDB [online]. [cit. 2008-03-16]. Dostupný z WWW: <<http://www.chem.agilent.com/Scripts/Generic.ASP?IPage=42457&indcol=N&prodcol=N>>.



## 7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AMP	Ampicilin
AMOX	Amoxicilin
APCI	Chemická ionizace při atmosférickém tlaku
CE	Kapilární elektroforéza
CEC, EC	Kapilární elektrochromatografie v naplněných kapilárách
CE-MS	Spojení CE s hmotnostním spektrometrem
CGE	Kapilární gelová elektroforéza
CI	Chemická ionizace
CIEF, IEF	Kapilární izoelektrické fokusování
CIPIC	4-(2'-kyanoisoindolyl)fenylisothiokyanát
CITP, ITP	Kapilární izotachoforéza
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
ČOV	Čistírna odpadních vod
DAD	Detektor diodového pole
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ECD	Detektor elektronového záchytu
EDTA	Ethylendiaminotetraoctová kyselina
EI	Elektronová ionizace (ionizace nárazem elektronu)
ELSD	Detektor rozptylu světla
EOF	elektroosmotický tok
ESI	Ionizace elektrospřejem
FID	Plamenový ionizační detektor
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie
HPLC-CLD	Spojení HPLC s chemiluminiscenčním detektorem
HPLC-DAD	Spojení HPLC s detektorem diodového pole
HPLC-FLD	Spojení HPLC s fluorimetrickým detektorem
HPLC-MS	Spojení HPLC s hmotnostním spektrometrem
HPLC-MS-MS	Spojení HPLC s tandemovým hmotnostním spektrometrem
GC	Plynová chromatografie
GC-AED	Spojení GC s atomovým emisním detektorem
GC-MS	Spojení GC s hmotnostním spektrometrem
GC-MS-MS	Spojení GC s tandemovým hmotnostním spektrometrem
GLC	Plynová rozdělovací chromatografie
GSC	Plynová adsorpční chromatografie
LC	Kapalinová chromatografie
MECC	Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
MEKC	Micelární elektrokinetická chromatografie
MIC	Minimální inhibiční koncentrace antibiotika
mRNA	Mediátorová (zprostředkující přenos) RNA
MS	Hmotnostní spektrometr
PAB	Kyselina p-aminobenzoová
PEN G	Penicilin G (benzylpenicilin)
PTFE	Polytetrafluoroethylen (teflon)
RNA	Ribonukleová kyselina
SDS	dodecylsírán sodný (sodium dodecylsulfate)
SPE	Extrakce tuhou fází
TCD	Tepelně vodivostní detektor

## 8. SEZNAM ODBORNÝCH POJMŮ

anafylaktický šok	druh alergie, vzniká téměř okamžitě po podání alergenu přecitlivělému jedinci
analgetika	léčiva používaná k úlevě od bolesti
antagonistické působení	protikladné působení
cytolýza	rozpad buňky
depotní vazba léčiv	vazba s velmi pomalým uvolňováním léčiva
intersticiální tekutina	mezibuněčná tekutina
intramuskulární podání	podání do svalu
intravenózní podání	podání do žíly
parenterální podání	jiné než perorální podání (mimostřevní podání)
perorální podání	podání ústy
postantibiotický efekt	dobu, po kterou je růst bakterie ještě dále inhibován po poklesu antibiotika pod MIC.
pyogenní	hnisavý, zánětlivý

## **9. SEZNAM PŘÍLOH**

Příloha č.1: Beta-laktámová antibiotika - rozdělení

Příloha č.2: Ostatní antibiotika - rozdělení

## 10. PŘÍLOHY

Příloha č.1: Beta-laktámová antibiotika - rozdělení [13]

<b>Peniciliny</b>	základní peniciliny	benzylpenicillin (penicillin G), phenoxymethylpenicillin (penicillin V), penamecillin
	stabilní vůči stafylokokové penicilináze	oxacillin, cloxacillin, dicloxacillin, flucloxacillin
	širokospektré peniciliny aminopeniciliny	ampicillin, pivampicillin, bacampicillin, amoxycillin
	karboxypeniciliny	ticarcillin
	acylureidopeniciliny	piperacillin
<b>Cefalosporiny</b>	1. generace	parenterální: cefalotin, cefaloridin, cefazolin, cefapirin perorální: cefalexin, cefadroxil, cefradin
	2. generace	parenterální: cefuroxim, cefamandol, cefonicid, ceforanid, cefotiam perorální: cefuroxim axetil, cefaclor, cefpodoxim proxetil, cefprozil
	3. generace	parenterální: cefotaxim, ceftriaxon, ceftizoxim, ceftazidim, cefoperazon, cefsulodin perorální: cefixim, ceftibuten, cefetamet pivoxil
	4. generace	cefpirom, cefepim
<b>Cefamyciny</b>		cefoxitin, moxalactam, cefmetazol
<b>Novější β-laktámová antibiotika</b>	monobaktamy	aztreonam
	karbapenemy	imipenem/cilastatin, meropenem, ertapenem
<b>Kombinace antibiotik s inhibitory β-laktamás</b>	kyselina klavulanová	ampicillin + kys. klavulanová = AMS (Unasyn, Sulfamicilin) amoxicillin + kys. klavulanová = AMC (Augmentin) ticarcillin + kys. klavulanová = Timentin
	sulbactam	cefoperazon + sulbactam = Sulperazon
	tazobactam	piperacillin + tazobactam = Tazocin

Příloha č.2: Ostatní antibiotika - rozdělení [13]

<b>Amfenikoly</b>		chloramphenikol, thiamphenikol
<b>Tetracykliny</b>		doxycyclin, minocyclin
<b>Makrolidy</b>		erythromycin, oleandomycin, spiramycin, josamycin, roxithromycin, clarithromycin, dirithromycin
<b>Azalidy</b>		azithromycin
<b>Streptograminy</b>		quinupristin, dalfopristin (Synercid)
<b>Ketolidy</b>		telithromycin
<b>Oxazolidinony</b>		linezolid
<b>Linkosaminy</b>		lincomycin, clindamycin
<b>Aminoglykosidy</b>		parenterální: streptomycin, kanamycin, gentamicin, sisomicin, netilmicin, tobramycin, amikacin, asepticin perorální: neomycin
<b>Glykopeptidy</b>		vancomycin, teicoplanin
<b>Ostatní antibiotika</b>		kyselina fusidová, rifampicin, fosfomycin, polymyxin B, colistin, spectinomycin
<b>Antibiotika pro lokální podání</b>		neomycin, bacitracin, mupirocin, tyrothricin
<b>Antituberkulotika</b>	antibiotika	streptomycin, rifampicin, capreomycin, cycloserin
	chemoterapeutika	kyselina <i>p</i> -aminosalicylová, isoniazid, ethambutol, ethionamid, pyrazinamid
<b>Sulfonamidy</b>	sulfonamidy	sulfadimidin, sulfisoxazol (sulfafurazol), sulfathiazol, sulfamethoxazol, sulfametoxydiazin, phtalylsulfathiazol
	kombinace	co-trimoxazol (trimethoprim + sulfamethoxazol)
<b>Chinolonová chemoterapeutika</b>	nefluorované chinolony	kyselina nalidixová, kyselina oxolinová, kyselina pipemidová
	fluorochinolony	norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin, pefloxacin, fleroxacin, lomefloxacin, sparfloxacin, trovafloxacin, levofloxacin, moxifloxacin
<b>Imidazoly</b>		metronidazol, ornidazol, tinidazol
<b>Ostatní chemoterapeutika</b>		nitrofurantoin, trimethoprim, methenamin